
Simultane Messung und Stimulation elektrischer und mechanischer Eigenschaften von Membranproteinen

DISSERTATION



Stefan Scheuer

München 2013

Simultane Messung und Stimulation
elektrischer und mechanischer
Eigenschaften von Membranproteinen

Dissertation
an der Fakultät für Physik
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Stefan Peter Scheuer
aus Trier

München, den 14. Juni 2013

Erstgutachter: Prof. Hermann E. Gaub

Zweitgutachter: Prof. Joachim Rädler

Tag der mündlichen Prüfung: 25.07.2013

Zusammenfassung

Die Zellmembran isoliert den biologisch aktiven intrazellulären Raum elektrisch und mechanisch von dem die Zelle umgebenden Milieu. Sie konzentriert funktionelle Einheiten, biologisch relevante Moleküle und Strukturen und ermöglichte so erst die Entwicklung von Leben. Zusätzliche Funktionalität wird ihr durch eine Vielzahl von in ihr eingebetteten Proteinen verliehen. Als elektrische Isolationschicht ermöglicht die Zellmembran den Aufbau eines elektrischen Spannungspotentials zwischen intra- und extrazellulärem Raum, das die Energie für viele biologische Vorgänge bereitstellt. Den Aufbau und die Einstellung des Potentials übernimmt dabei eine Gruppe von Proteinen, zu denen die Ionenkanäle gehören, die nanometergroße Poren in der Zellmembran bilden und passiv oder aktiv geladene Teilchen transportieren. Aufgrund des hohen elektrischen Widerstandes der Zellmembran und der geringen Dicke von wenigen Nanometern bewirkt das Potential in ihr ein enorm hohes elektrisches Feld von ca. 10^7 V/m. Es verwundert deswegen nicht, dass viele der Membranproteine eine auf die Membranspannung sensitive Funktion besitzen. Die Membran selbst hat ebenfalls potentialabhängige physikalische Eigenschaften wie zum Beispiel ihre intrinsische mechanische Spannung.

Die hochsensitive Patch-Clamp-Technik erlaubt es, die elektrische Spannung einer Zelle oder eines Membranstücks in beliebiger Weise festzulegen und die entstehenden Ladungsflüsse so genau zu vermessen, dass Ströme durch einzelne Ionenkanäle bestimmt werden können. Damit ist es möglich, die Funktion potentialabhängiger Proteine künstlich zu stimulieren. In Kombination mit der Technik der hochpräzisen Kraftspektroskopie, die Kräfte in einer für einzelne Proteine relevanten Größenordnung detektiert, können die elektrischen und mechanischen Eigenschaften von Proteinen sehr gezielt stimuliert und simultan präzise vermessen werden.

Diese Arbeit befasst sich damit verschiedene Proteine mit solch einem kombinierten Patch-Clamp-AFM-Aufbau zu untersuchen, um Erkenntnisse über deren Funktionsweise zu erhalten. Dazu wurden neben den elektrischen Eigenschaften simultan die mechanische Membranspannung gepatchter Zellen vermessen. Auf verschiedene Weise wurden Cantileverspitzen mit der Membran in Kontakt gebracht, um deren Kraftantwort auf elektrische Spannungspulse zu ermitteln. Das erste untersuchte Membranprotein Prestin spielt eine Schlüsselrolle im Gehörsinn der Säugetiere, indem es den äußeren Haarzellen, Sensorzellen in der Cochlea, die Fähigkeit verleiht, elektrische Energie in mechanische Energie umzuwandeln und umgekehrt. Die länglichen, zylindrischen Zellen ändern bei Variation des Membranpotentials ohne die Hydrolyse von ATP ihre Länge oder bauen bei eingeschränkter Bewegungsfreiheit eine Kraft auf. Einige Aspekte der Funktionsweise von Prestin sind bisher noch nicht genau geklärt, im Speziellen die genaue Kopplung zwischen seinen mechanischen und elektrischen Eigenschaften. Die elektrische Signatur von Prestin konnte als eine glockenförmige nichtlineare Änderung der Kapazität in Abhängigkeit der elektrischen Spannung gemessen werden. Die mechanische Spannungsänderung in der Membran, die ebenfalls von der elektrischen Spannung abhängt und durch Prestin verstärkt wird, wurde durch die Kraftantwort eines mit der Membran wechselwirkenden Cantilevers bestimmt. Die Experimente wurden an einer Prestin exprimierenden HEK293-Zelllinie durchgeführt.

Um die elektrischen Parameter einer gepatchten Zelle zu vermessen, wurden spezielle Spannungspulse angelegt. Diese Pulse sind normalerweise nicht optimiert für eine

simultane Messung spannungsabhängiger mechanischer Kräfte. Es wurde daher eine Methode entwickelt, die theoretisch bei Kenntnis der mathematischen Zusammenhänge der beteiligten elektrischen Komponenten aus der Stromantwort fast beliebiger Spannungspulse die gesuchten Parameter ermittelt. Dazu wurde die Stromantwort simuliert und die Differenz zu den gemessenen Daten mit Hilfe eines Direktsuchverfahrens minimiert. Die Ergebnisse dieser Methode, bei einer für die Kraftmessung geeigneten Spannungsrampe, waren präzise bezüglich der Ermittlung der passiven Zellparameter einer gepatchten Zelle. Eine Abschätzung des Prestingehalts ermöglichte es, Prestin exprimierende Zellen zu identifizieren.

Um die genaue Kopplung zwischen der Elektromotilität von Prestin und seiner nichtlinearen Kapazität zu untersuchen, wurde auf Kosten der Genauigkeit der Kraftmessung ein für die Kapazitätsmessung optimierter Spannungspuls angelegt. Präzise Messwerte der nichtlinearen Kapazität konnten nun mit entsprechenden Kraftkurven simultan gemessen werden. Ein Vergleich der Daten lieferte unterschiedliche Reaktionsbereiche und somit Hinweise gegen eine direkte Kopplung der elektrischen und mechanischen Charakteristiken. Entsprechende Beobachtungen an heterologen Prestinsystemen wurden hier erstmals gemacht.

Um die Verteilung von Prestin in der Zellmembran zu untersuchen, wurde die Messungen der spannungsinduzierten Membranbewegung an unterschiedlichen Stellen auf der Zelloberfläche durchgeführt. Die Daten zeigten eine breite Streuung mit zwei unterschiedlichen Maxima der Reaktion, was auf eine inhomogene Verteilung der Prestinmoleküle schließen lässt.

Die breite Varianz einzelner Reaktionsmessungen im Zellkontakt adressierend, wurde die Technik so erweitert, dass die Membranbewegung quasikontinuierlich bestimmt wurde. Dies ermöglichte durch eine erhöhte Statistik die Reaktionen der Zellmembran, die sonst kleiner als die Varianz der Messmethode gewesen wären, genauer zu untersuchen. Nun konnten auch während des Eindruck- und Rückzugvorgangs die Entwicklung der Reaktion verfolgt werden. Die kontinuierliche Reaktionsmessung ermöglichte es, das Zusammenspiel von membranbasierter und zytoskelettbasierter Kraft auf den Cantilever abzuschätzen. Bei stark reagierenden Zellen konnten so Hinweise auf die Versteifung der Membran während der Reaktionszunahme gefunden werden. Die Genauigkeit konnte des Weiteren in der Weise erhöht werden, dass sogar die Reaktionen von Membrantethern, die während des Entferns der Cantileverspitze von der Zellmembran entstehen, analysiert werden konnten. Die ermittelten Daten sind konsistent mit denen anderer Gruppen, die mit Hilfe der noch präziseren Optical-Tweezers-Methode bestimmt wurden.

In einem weiteren Projekt wurde versucht, mit an Cantilevern gebundenen Agonisten eines ligandengesteuerten Ionenkanals, mechanisch kontrollierte Ionenkanalöffnungen zu beobachten. Dazu wurden funktionalisierte Cantilever mit den Zellen in Kontakt gebracht und die simultan aufgenommene Stromspur auf charakteristische Signaturen von Ionenkanalöffnungen untersucht. Die beiden analysierten Ionenkanäle waren der purigene P2X7- sowie der GluK2-Kanal. Für GluK2 stand mit dem Molekül MAG bereits ein für die Funktionalisierung geeigneter Agonist zur Verfügung. In Patch-Clamp-Versuchen wurde mit EDA-ATP ein entsprechender Agonist für den P2X7-Kanal identifiziert. Bei durchgeführten kombinierten Patch-Clamp-AFM-Experimenten konnten keine mit Sicherheit durch den Cantileverkontakt induzierten Ströme gemessen werden.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	3
2	Grundlagen.....	5
2.1	Membranproteine	5
2.1.1	Ionenkanäle	5
P2X7		5
GluK2		6
2.1.2	Prestin.....	7
Eigenschaften und Struktur von Prestin.....		7
Die nichtlineare Kapazität (NLC)		8
Prestin-Modelle.....		10
Verteilung von Prestin in der Membran		10
2.2	Rasterkraftmikroskop.....	12
2.2.1	Funktionsprinzip.....	12
2.3	Patch-Clamp-Technik.....	13
2.3.1	Automatisiertes Planares Patch-Clampen.....	13
2.3.2	Die Zellparameter	14
2.4	Spannungsinduzierte Membranbewegung.....	16
2.4.1	Mechanische Spannung in einer elektrochemischen Doppelschicht.....	16
2.4.2	Mechanische Spannung in der Zellmembran.....	17
2.4.3	Spannungsinduzierte Membran- und Cantileverbewegung.....	18
2.4.4	Zellmodelle	19
3	Methoden.....	21
3.1	Kombiniertes Planares Patch-Clamp-AFM	21
3.2	Messungen und Messwerte	23
3.2.1	Messung der Eindrückkraft und Eindrücktiefe.....	24
3.2.2	Messung relevanter Zellparameter	25
Die Lock-in-Technik.....		25
Phasenbestimmung mit einem virtuellen Lock-in-Verfahren		28
Implementierung der Lock-in-Technik		29
Die Spannungsrampenmethode		30
Implementierung der Spannungsrampenmethode.....		31
Berechnung der Stromantwort.....		31
Der Hooke-Jeeves-Algorithmus		32
Messung der nichtlinearen Kapazität.....		33
3.2.3	Messung der Zellreaktion	35
3.3	Setup I: Reaktionsbestimmung nach Eindrückung.....	36
3.4	Setup II: Kontinuierliche Reaktionsbestimmung.....	37
4	Ergebnisse und Diskussion.....	38
4.1	Bestimmung der elektrischen Zellparameter	38
4.1.1	Testmessungen an einer Modelzelle.....	38
4.1.2	Messung der nichtlinearen Kapazität von Prestinzellen	40
NLC-Bestimmung mit der Lock-in-Methode		41
NLC-Bestimmung mit der Spannungsrampenmethode		42
Abschätzung des Prestingehalts.....		44
4.2	Prestin.....	48
4.2.1	Reaktionsmessungen nach Eindrückung.....	48
Versuche mit Cantilevern ohne Spitze		48
Simultane Messung von Kraft und Kapazität in Abhängigkeit der Spannung.....		48
Variation der Eindrückkraft		53
Konstante Eindrückkraft		56
Variation der Eindrücktiefe.....		57
Zusammenfassung aller Eindrückversuche.....		57
Negative Reaktionen.....		62

Frequenzabhängigkeit der Reaktion	65
4.2.2 Messungen mit kontinuierlicher Reaktionsbestimmung	67
Versuche mit Cantilevern ohne Spitze	69
Reaktionsentwicklungen während des Eindrückvorgangs	71
Stark reagierende Prestinzellen	74
Reaktionsentwicklungen während der Rückzugsphase	76
4.2.3 Vergleich der Eindrück- und Rückzugsexperimente	79
4.2.4 Verwendete Cantileverspitzen	81
4.3 Öffnen von Ionenkanälen mit Agonisten am Cantilever	83
4.3.1 Versuche mit P2X7-Ionenkanälen	83
Einfluss der Messlösungen	85
EDA-ATP als Agonist	86
Abschätzung der maximal möglichen Stromantwort	87
Kombinierte Experimente	89
4.3.2 Versuche mit ionotropen Glutamatrezeptoren (GluK2)	90
4.3.3 Vorversuche für Einzelkanalmessungen	91
5 Ausblick	94
6 Anhang	96
6.1 Berechnungen	96
6.1.1 Rechnung 1	96
6.1.2 Rechnung 2	96
6.2 Zellkultur	97
6.3 Funktionalisierung der Cantilever	98
7 Literaturverzeichnis	99
8 Danksagung	103

1 Einleitung

Zellen, die kleinsten lebenden Einheiten von Organismen, grenzen sich mit Hilfe der Zellmembran von ihrer Umgebung ab. Diese besteht aus einer ca. 5 nm starken Lipiddoppelschicht. In der Zellmembran eingebettet befindet sich eine Vielzahl von unterschiedlichen Membranproteinen, die ein breites Aufgabenspektrum erfüllen. Sie ermöglichen der Zelle mit ihrer Umgebung zu kommunizieren, geladene und ungeladene Teilchen auszutauschen, auf äußere Einflüsse zu reagieren oder mechanische Verbindungen zu anderen Zellen oder Substraten herzustellen. Aufgrund der Fülle an lebenswichtigen Aufgaben ist es nicht verwunderlich, dass ungefähr die Hälfte aller zugelassenen Medikamente auf die Mechanismen der Membranproteine zielt. Die Tatsache, dass fast 30 Prozent der im menschlichen Genom kodierten Proteine Membranproteine sind, weist ebenso auf deren bedeutende Rolle hin [1]. Es ist deswegen von großem Interesse, die Funktionsweise dieser Proteine aufzuklären und die zugrundeliegenden Mechanismen zu verstehen.

Eingebettet in die Lipiddoppelschicht sind die Membranproteine dem enorm hohen elektrischen Feld (ca. 10^7 V/m) ausgesetzt, das in der Membran herrscht. Grund für dieses elektrische Feld ist ein elektrochemischer Gradient von biologisch relevanten Ionen Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} , der von speziellen Transportproteinen durch aktive und passive Transportprozesse zwischen intra- und extrazellulärer Seite der isolierenden Membran eingestellt wird.

Da die Funktion mancher Membranproteinen direkt mit dem elektrischen Feld und somit dem Membranpotential verknüpft ist, kann sie mit Hilfe der Vermessung ihrer elektrischen Eigenschaften charakterisiert werden. Dabei kann nicht nur der Triggermechanismus sondern auch die Funktion selbst elektrischer Natur sein. In der Regel bewegen sich Sensorladungen des Proteins durch das Feld, was eine Konformationsänderung bewirkt [2]. Im Falle der spannungsgesteuerten Ionenkanäle wird dadurch ein Ionentrnsport möglich. Bei starken Konformationsänderungen können die bewegten Sensorladungen in Form einer elektrischen Signatur gemessen werden.

Neben Membranproteinen deren Funktion anhand einer einzigen physikalischen Größe charakterisiert werden kann, gibt es auch solche, deren Wirkung verschiedene Größen simultan betrifft. Ein interessantes Beispiel hierfür ist in der SLC26-Familie zu finden, eine Gruppe von sogenannten Anionen-Transportern, die für den Transport negativ geladener Teilchen durch die Membran sorgt. Eines ihrer Mitglieder, das Protein Prestin, hat im Laufe der Evolution durch kleinere Änderungen seiner Aminosäuresequenz eine völlig neue Eigenschaft entwickelt. Es ist in der Lage, elektrische Energie direkt in mechanische Energie umzuwandeln. Die Eigenschaft Anionen zu transportieren hat es dabei so gut wie verloren [3]. Mit seiner Fähigkeit Energie zu konvertieren spielt es eine wichtige Rolle im sensorischen Prozess des Hörens. Es hilft, die Dämpfung der im Gehörsinn verarbeiteten mechanischen Schallwellen zu vermindern indem es elektrische Energie in mechanische Energie umwandelt und in das Hörsystem einkoppelt. Die Funktion kombiniert somit also eine mechanische und elektrische Komponente.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es unter anderem, simultan die mechanischen und elektrischen Eigenschaften des Proteins Prestin zu vermessen um das Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen zu erweitern. Als Messinstrument kam dafür die von

mir weiterentwickelte Kombination eines Patch-Clamp-Aufbaus mit einem Kraftmikroskop zum Einsatz.

Eine weitere Klasse von Ionenkanälen, die durch spezifische Bindung eines Ligandenden Ionentransport ermöglichen, wurde im zweiten Teil der Arbeit untersucht, um zeitlich und zusätzlich mechanisch kontrolliert Kanalöffnungen zu untersuchen. Die mechanische Kontrolle erfolgte dabei über die Fixierung der Liganden am Kraftsensor des Kraftmikroskops, was nicht nur den genauen Zeitpunkt der Triggerung sondern auch die lokale Konzentration des Liganden steuerte und die Messung der Bindungskräfte des Liganden am Ionenkanalrezeptor erlaubte.

2 Grundlagen

2.1 Membranproteine

Die im Folgenden beschriebenen Membranproteine sind zum einen spezielle ligandengesteuerte Ionenkanäle und zum anderen das Protein Prestin. Die Ionenkanäle haben gemein, dass sie eine exponierte Ligandenbindungsstelle besitzen.

2.1.1 Ionenkanäle

Das intra- und extrazelluläre Milieu einer Zelle unterscheidet sich unter anderem in den Konzentrationen der biologisch relevanten Ionen Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} und organischen Anionen, was zu einem elektrochemischen Gradienten führt. Die Zellmembran mit ihrer isolierenden Eigenschaft verhindert den Ausgleich dieses Gradienten. Spezielle Transmembranproteine wiederum ermöglichen bestimmten Ionen das Durchqueren der Zellmembran, indem sie selektive Poren bilden. Der Transport geschieht dabei auf zwei verschiedene Arten: Bei den passiven Ionenkanälen dient der elektrochemische Gradient als Triebkraft, aktive Kanäle benötigen für den Transport Energie, zum Beispiel aus der Hydrolyse von ATP, um Ionen auszutauschen. Ein Beispiel für einen aktiven Transporter ist die Natrium-Kalium-Pumpe, die eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung und Aufrechterhaltung des Transmembranpotentials spielt. Passive Ionenkanäle sind mit verschiedenen Öffnungs- und Schließmechanismen ausgestattet. Sie reagieren zum Beispiel sensitiv auf die elektrische Membranspannung, Licht, Temperaturänderungen, das Binden eines Liganden oder auf mechanische Einflüsse. Diese Reize bewirken eine Konformationsänderung (molekulare Umordnungen) des Proteins, die mit einer Änderung der Leitfähigkeit des Kanals einhergeht. Hat man eine Zelle so präpariert, dass die Leitfähigkeit der Zellmembran gemessen werden kann, ist es möglich die Reaktion des Ionenkanals auf einen bestimmten Stimulus zu untersuchen. Eine hierfür geeignete Methode ist die weiter unten beschriebene Patch-Clamp-Technik. Ligandengesteuerte Ionenkanäle untersucht man beispielsweise, indem man Lösungen mit verschiedenen Konzentrationen der Agonisten (Liganden) an den zur Messung präparierten Zellen appliziert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde unter anderem versucht, den Vorgang der Ligandenbindung und die damit verbundenen Kanalöffnungen mechanisch kontrolliert mit Hilfe an einen Kraftsensor gebundener Agonisten durchzuführen. Die zu diesem Zweck ausgewählten ligandengesteuerten Ionenkanäle werden im Folgenden beschrieben.

P2X7

Die ligandengesteuerten Ionenkanäle der Purinrezeptorfamilie P2X sind nach der Bindung von extrazellulärem ATP durchlässig für monovalente (Na^+ , K^+) als auch divalente (Ca^{2+}) Kationen. Die sieben Mitglieder (P2X1-P2X7) sind alle als Homo- bzw. Heterotrimer aufgebaut. Eine Untereinheit besteht dabei aus zwei hydrophoben Transmembrandomänen, die durch eine lange, extrazelluläre Domäne verbunden sind [4]. Sie spielen eine Rolle bei verschiedenen physiologischen Prozessen wie zum Beispiel der Neurotransmission, bei Endzündungen sowie beim Tast- und Schmerzempfinden [5].

Der P2X7-Kanal kommt nur als Homotrimer vor und hat als einziger Ionenkanal dieser Familie die Eigenschaft nicht zu desensibilisieren. Agonisten sind unter anderem ATP und BzATP (2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)ATP) mit einer mittleren effektiven Konzentration (EC_{50}) von ca. $10\mu M$ bzw. $100\mu M$, wobei BzATP ca. zehnmal potenter ist. Der Effekt der beiden Agonisten wird verstärkt durch die Reduktion von extrazellulärem Magnesium bzw. Calcium [6]. Bei unterschiedlichen Konzentrationen bzw. wiederholter Zugabe der Agonisten zeigen Zellen mit dem P2X7 Kanal eine komplizierte Struktur der Aktivierungsströme [7]. Der Kanal zeigt dabei allerdings wie schon erwähnt keine Desensibilisierung. Es scheint so, als müssen alle drei Bindungstaschen gleichzeitig besetzt sein, um eine Öffnung des Kanals zu bewirken [8, 9].

Die Struktur des P2X7-Kanals ist, anders als die des P2X4-Kanals, bisher nicht gelöst. Ähnlichkeiten in der Sequenzabfolge des extrazellulären Loops lassen aber Schlüsse auf die Lage der ATP-Bindungstasche zu. Wie aus Abbildung 1 ersichtlich ist, scheint die Bindungstasche von außen lateral zugänglich zu sein.

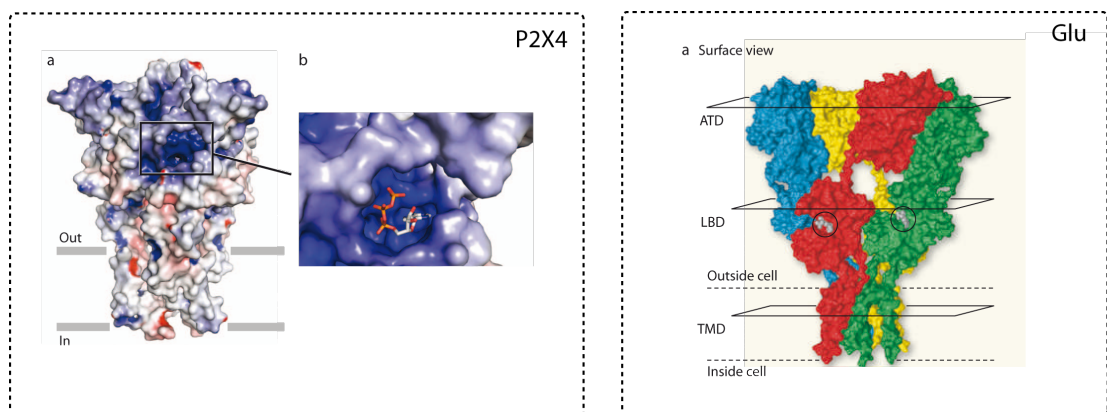


Abbildung 1 – Struktur des P2X4- und Glutamat-Kanals mit Liganden-Bindungstaschen. Die Strukturen des P2X4-Kanals (links) und des Glutamatkanals (rechts) zeigen, dass die Liganden-Bindungstaschen lateral zugänglich sind. Grafik aus [10] (P2X4) und aus [11] (Glutamat).

GluK2

Glutamatrezeptoren sind Transmembranproteine in Neuronen, die den Neurotransmitter Glutamat spezifisch binden. Neben den metabotropen gibt es die ligandengesteuerten, also ionotropen Glutamatrezeptoren, die in Gruppen benannt nach einem individuellen, alternativen Agonisten aufgeteilt werden: AMPA- (englische Abkürzung für α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid), NMDA- (N-Methyl-D-Aspartat) und Kainat-Rezeptoren. Nach Bindung von Liganden sind sie permeabel für Na^+ und K^+ sowie einige für Ca^{2+} . Die ionotropen Glutamatrezeptoren regeln eine Vielzahl von Prozessen im Gehirn, im Rückenmark, auf der Netzhaut oder im peripheren Nervensystem [12]. Kristallographiestudien haben ihre Struktur mit einer Genauigkeit von wenigen Ångström auflösen können (vgl. Abbildung 1, [13]). Demnach sind ligandengesteuerte Glutamatrezeptoren als Tetramere aus vier Untereinheiten aufgebaut, die jeweils aus einer extrazellulären N-Terminal-Domäne (NTB), einer extrazellulären Liganden-Bindungs-Domäne (LBD) und einer Transmembrandomäne (TMD) bestehen.

Der Ionenkanal GluK2 (GluR6) ist ein Mitglied der beschriebenen Familie der Kainat-Rezeptoren. Er hat einen EC_{50} -Wert von ca. $400\mu M$ und desensibilisiert nach einer kurzen Zeit ($\tau_{des} = 4.5ms$) [14]. Die Eigenschaft der Desensitisation kann mit Hilfe des

allosterisch wirkenden Lektin Concanavalin A (Con A) aufgehoben werden. Nach Zugabe von Con A zeigt der Kanal eine konstante Leitfähigkeit, die etwas geringer als die initiale Leitfähigkeit ohne Con A Behandlung ist [15]. Volgraf et al. nutzten die genaue Kenntnis der Struktur der Bindungstasche des GluK2 Rezeptors [16], um mit geeigneten Mutationen einen lichtschtbaren Linker inklusive Glutamatrest als Agonist an der LBD anbringen zu können [17]. Mittels Lichteinstrahlung konnte nun der Glutamatkanal „an und aus“ geschaltet werden. Es ist also möglich, den GluK2-Kanal mit der mechanischen Bereitstellung von Agonisten reversibel zu öffnen.

2.1.2 Prestin

Prestin ist ein Transmembranprotein, welches sich in der lateralen Zellmembran der äußeren Haarzellen (outer hair cells, OHC), den Sinneszellen der Hörschnecke (Cochlea), befindet. Es besitzt die besondere Fähigkeit elektrische Spannung direkt in Bewegung umzuwandeln ohne dabei ATP zu hydrolysieren. Es handelt sich daher um ein nicht enzymatisches Motorprotein. Die durch Prestin verliehene Eigenschaft der Elektromotilität der OHCs dient wahrscheinlich dazu, der durch hydrodynamische Reibung verursachten Signalabschwächung interaktiv entgegenzuwirken. Prestin spielt damit eine entscheidende Rolle im komplexen Hörprozess von Säugern.

Die genauen Mechanismen und Funktionsweisen des Hörsinns blieben aufgrund ihrer Komplexität lange Zeit ein Rätsel. Ein sehr erfolgreiches Modell zur Erklärung der passiven Frequenzselektion entwickelte George von Békésy, der für seine „Entdeckungen im physikalischen Mechanismus der Erregung in der Schnecke des Ohres“ 1961 den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin erhielt. Die ersten Hinweise auf eine aktive Komponente im Sensorsystem des Hörsinns waren dann aktiv emittierte Echosignale, die nach einer impulsartigen Anregung der Cochlea gemessen werden konnten (Kemp 1978). Intensivierte Forschungen auf diesem Gebiet führten in den 1980ern zur Entdeckung der Elektromotilität der äußeren Haarzellen [18, 19]. Die systematische Suche nach den verantwortlichen Proteinen für das Phänomen endete vorläufig im Jahr 2000 mit der Identifizierung des Transmembranproteins Prestin [20].

Eigenschaften und Struktur von Prestin

Prestin ist ein Mitglied der Familie der Anionen-Transporter SLC26, besteht aus 744 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 81,4 kDa. Die genaue Struktur des Proteins ist bisher nicht gelöst. Als gesichert gilt, dass sowohl ein kurzer N- als auch ein sehr langer C-Terminus cytoplasmatisch ausgerichtet sind, was eine gerade Anzahl an Transmembrandomänen impliziert. Ungeklärt ist allerdings bisher deren Anzahl (10 oder 12 [3]), wie auch die Frage, ob Prestin als Mitglied einer Transporterfamilie tatsächlich die Fähigkeit hat, Anionen zu transportieren. Der Fakt, dass die Elektromotilität wie auch die unten beschriebene kapazitive Signatur in Form einer nichtlinearen Kapazität (nonlinear capacitance, NLC) von Prestin abhängig von intrazellulären Chlorkonzentration ist, führten zu der Entwicklung des Modells des externen Spannungssensors in Form eines gebundenen Chloridions oder ähnlicher Ionen [21]. Neue Experimente geben allerdings Grund zur Annahme, dass die Chloridionen eine allosterische Funktion haben [22]. Die Suche nach einem alternativen, für die Spannungsabhängigkeit erforderlichen Spannungssensor hat bisher noch keine eindeutige Antwort geliefert [23].

Isolierte äußere Haarzellen zeigten Längenänderungen ihrer Zellkörper aufgrund von Änderungen der Transmembranspannung [18, 19]. Hyperpolarisation führten dabei zu einer Verlängerung, Depolarisation zu einer Verkürzung der OHC. Inverse Experimente, bei denen die Länge der Zellen geändert wurde zeigten eine entsprechende Stromantwort [24]. Es liegt daher nahe von piezoelektrischem Verhalten zu sprechen. Die entsprechenden Zusammenhänge und Gesetzmäßigkeiten wurden in weiterführenden Untersuchungen bestätigt [25]. Da Prestin seine Energie für den Konformationswechsel direkt aus dem elektrischen Feld zieht, kann es viel schneller agieren als enzymatische Motorproteine. Reaktionsfrequenzen von über 80kHz konnten bisher nachgewiesen werden [26]. Eine weitere physikalische Eigenschaft von OHC ist eine spannungsabhängige Steifigkeit der Zellmembran, die anscheinend mit der spannungsabhängigen Bewegung verknüpft ist [27]. Die Beteiligung anderer als membranbasierter Komponenten an der beobachteten hochfrequenten Elektromotilität konnte ausgeschlossen werden [28].

Die nichtlineare Kapazität (NLC)

Membranproteine, die eine spannungsabhängige Eigenschaft besitzen, benötigen eine entsprechende elektrisch geladene Sensordomäne. Dieser Spannungssensor bewegt sich aufgrund einer Potentialänderung im elektrischen Feld und bewirkt eine Konformationsänderung des Proteins. Werden bei einer Änderung der Transmembranspannung solche Ladungsbewegungen induziert, addieren sie sich zum normalen kapazitiven Strom der Membran. Man spricht in diesem Fall von Torströmen (gating currents), die erstmals von C. M. Armstrong und F. Bezanilla anhand von spannungsgesteuerten Natriumkanälen mit der Voltage-Clamp Technik nachgewiesen werden konnten [29]. Die Kapazität der Membran in die solche Proteine eingebettet sind, ist damit ebenfalls spannungsabhängig.

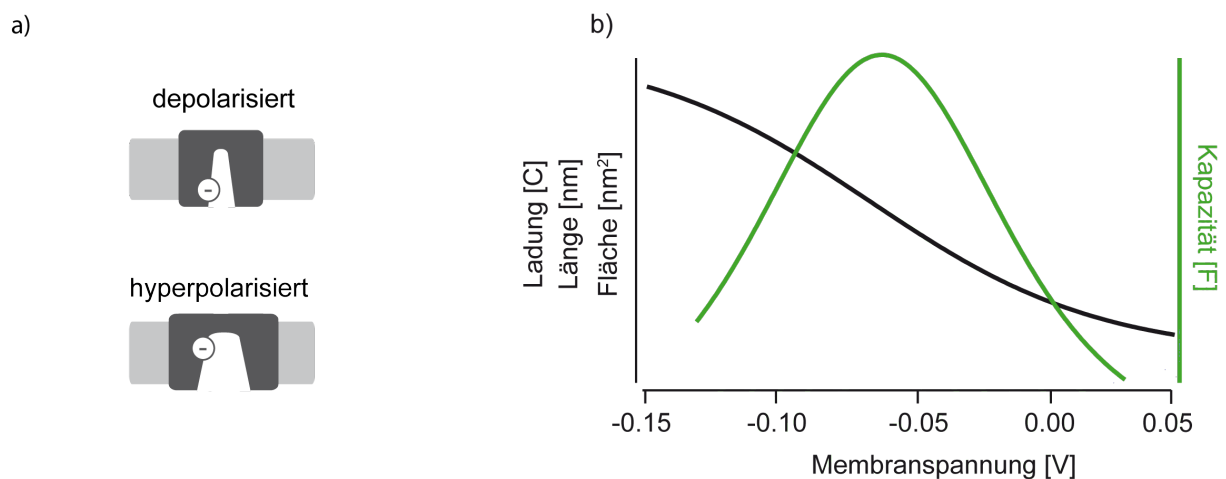


Abbildung 2 – Prestin und seine nichtlineare Kapazität. Ist eine Zelle bzw. ihre Membran (hellgrau) depolarisiert, so befinden sich die Prestinmoleküle (dunkelgrau) vorzugsweise in ihrem kompakten Zustand (a). Bei Hyperpolarisation wechseln sie in den ausgedehnten Zustand (länger, mehr Fläche). Als Sensor für diese Konformationsänderung dient eine geladene Domäne (hier als negativ angenommen) des Prestinmoleküls, die sich in Folge des geänderten Potentials innerhalb der Membran bewegt – gleichbedeutend einem Ladungsstrom. Das Verhalten im Ensemble (b) hat deswegen eine elektrische Signatur in Form einer nichtlinear von der Spannung abhängigen Kapazität (vgl. Gleichung (3)). Die Größen der bewegten Ladungen und geometrischen Änderungen zeigen ein sigmoidales Verhalten (vgl. Gleichung (4)).

Ein sehr einfaches Modell im Falle von Prestin geht davon aus, dass es zwei Zustände gibt: Einen kompakten (Depolarisation) und einen expandierten (Hyperpolarisation), der jeweils unterschiedlich große Membranflächen beansprucht (vgl. Abbildung 2). Berücksichtigt man nur die unterschiedlichen elektrischen Energien der beiden Zustände kann man die Wahrscheinlichkeit, in welchem Zustand ein Molekül sich befindet, mit Hilfe eines einfachen Boltzmannfaktors beschreiben. In diesen fließt die Größe der bewegten Sensorladung z ein. Bewegt sich die Sensorladung bei der Konformationsänderung nur durch einen Teil des elektrischen Feldes, also nicht durch die ganze Membran, schlägt sich das dementsprechend in der Größe von z nieder. In einem Ensemble von Molekülen können die insgesamt in einem Zustand befindlichen Ladungen zu einer Gesamtladung Q summiert werden. Die Größe von Q ist nun abhängig von der Membranspannung V und kann durch eine Zwei-Zustands-Boltzmannfunktion beschrieben werden:

$$Q(V) = \frac{Q_{\max}}{1 + e^{-\frac{V-V_h}{\alpha}}} \quad (1)$$

mit der maximalen Ladungsverschiebung Q_{\max} , der Halbwertspannung V_h und

$$\alpha = \frac{k_B T}{ze} \quad (2)$$

wobei k_B die Boltzmann-Konstante, T die Temperatur und e die Elementarladung ist.

Die erste Ableitung der Formel (1) nach V ergibt dann, unter der Berücksichtigung der nicht spannungsabhängigen Membrankapazität C_0 , den Zusammenhang zwischen der Kapazität C und der Spannung V

$$C(V) = C_0 + Q_{\max} \frac{e^{-\frac{V-V_h}{\alpha}}}{\alpha \left(1 + e^{-\frac{V-V_h}{\alpha}} \right)} \quad (3)$$

Dieses sehr einfache Model liefert einen Zusammenhang, der die gemessenen Daten bereits sehr gut beschreibt [30]. Es sei darauf hingewiesen, dass im Folgenden C_M im Kontext der Gleichung (3) C_0 genannt wird. Die typische Form der spannungsabhängigen Kapazität und der entsprechenden Ladungsverschiebung sind in Abbildung 2 dargestellt. Vermisst man in einem bestimmten Experiment eine Eigenschaft L der Zellen, die direkt mit der Konformationsänderung gekoppelt ist, wie zum Beispiel die Längenänderung der äußeren Haarzellen, so kann die Spannungsabhängigkeit ebenfalls entsprechend dem Zusammenhang der Gleichung (1) beschrieben werden:

$$L(V) = \frac{L_{\max}}{1 + e^{-\frac{V-V_h}{\alpha}}} \quad (4)$$

Prestin-Modelle

Da die Prestinmoleküle gegen mechanische Kräfte in der Zellmembran ihre Konformationsänderung durchführen, muss das oben beschriebene simple Modell bei entsprechenden Experimenten angepasst werden. Dies ist teilweise durch Einführen eines Energieterms im Exponenten des Boltzmannfaktors möglich. Um den Einfluss von solchen äußeren Faktoren zu untersuchen, wurden verschiedene Experimente an Prestinzellen durchgeführt und konnten relativ einfach durch eine entsprechende Erweiterung des Modells beschrieben werden. Es handelt sich dabei meistens um eine einfache Verschiebung der Halbwertsspannung V_h . Zu nennen wären Experimente, bei denen vor der Messung der nichtlinearen Kapazität verschiedene elektrische Haltespannungen [31], verschiedene Drücke [32] oder verschiedene Temperaturen angelegt wurden [33]. Als Haltespannung bezeichnet man die künstlich, mit der später beschriebenen Patch-Clamp-Technik, an den untersuchten Zellen angelegte Membranspannung. Die Technik erlaubt es ebenfalls den Innendruck einer Zelle zu ändern, was effektiv eine Änderung der mechanischen Spannung der Membran bedeutet. Letzteres kann auch mit osmotischen Gradienten erreicht werden.

Mit der Zeit wurden einige Experimente durchgeführt, die nicht mehr mit dem sehr einfachen Zwei-Zustands-Modell erklärt werden konnten. Es handelte sich dabei hauptsächlich um Untersuchungen, die mit Hilfe von unterschiedlichen intra- und extrazellulären Lösungen durchgeführt wurden, wobei vor allem Chloridionen ersetzt bzw. deren Konzentrationen geändert wurden. Die entsprechenden Daten deuten beispielsweise auf eine allosterische Funktion der Chlorid-Ionen hin [22].

Neueste Messungen zeigen sogar eine Entkopplung der Elektromotilität von der bisher als Signatur für diese geltenden nichtlinearen Kapazität. Bei den gemessenen Effekten handelt es sich um Differenzen in den Halbwertsspannungen [28]. In allen Prestin-Messungen zuvor sind keine signifikanten Unterschiede zwischen der Elektromotilität und der nichtlinearen Kapazität entdeckt worden [30, 34], was vor allem an der dafür nicht geeigneten Konstellation bestimmter Messparameter lag (Chloridkonzentrationen und Vermessungstechnik). Deswegen wurden die beiden Phänomene bisher als direkt gekoppelt angesehen. Der größte Teil der Experimente an Prestin ist infolgedessen ausschließlich anhand der Messung der nichtlinearen Kapazität durchgeführt worden, was auch an der geringeren Komplexität der dafür benötigten Setups liegt. Mit Hilfe des weiter unten beschriebenen kombinierten Patch-Clamp-AFM-System ist es möglich, eine simultane Bestimmung der Elektromotilität und der nichtlinearen Kapazität durchzuführen was im Rahmen dieser Arbeit getan wurde.

Verteilung von Prestin in der Membran

Die Prestindichte in der lateralen Zellmembran der OHC ist äußerst hoch. Bis zu 6000 Prestinpartikel pro μm^2 wurden in Gefrierbruch-Elektronenmikroskop-Untersuchungen ermittelt [34]. Die Partikel haben dabei ungefähr eine Größe von 10nm [35]. Mit diesem Wert kommt man auf eine maximale Dichte von ca. 10000 pro μm^2 . Die Prestinmoleküle beanspruchen also ungefähr 60% der Membranfläche. Es wird davon ausgegangen, dass diese Partikel Prestinhomomere sind. Untersuchungen über die Zusammensetzung der Homomere kamen zu dem Ergebnis, dass es sich dabei um Tetramere handelt [34, 36].

Prestinmoleküle, welche in heterologen Systemen wie zum Beispiel CHO (Chinese Hamster Ovary) Zellen oder HEK293 (Human Embryonic Kidney) Zellen exprimiert werden, kommen in einer viel geringeren Dichte vor [20, 37]. Die Verteilung in der

Membran ist dabei nicht homogen, vielmehr formen die Prestinmoleküle Mikrodomänen, in denen sich mehrere hundert Partikel zusammenschließen [35, 38] (vgl. Abbildung 3). Bei den in dieser Doktorarbeit verwendeten Zellen handelt es sich um eine HEK293-Zelllinie (im Folgenden nur mit HEK abgekürzt), die Prestin exprimiert.

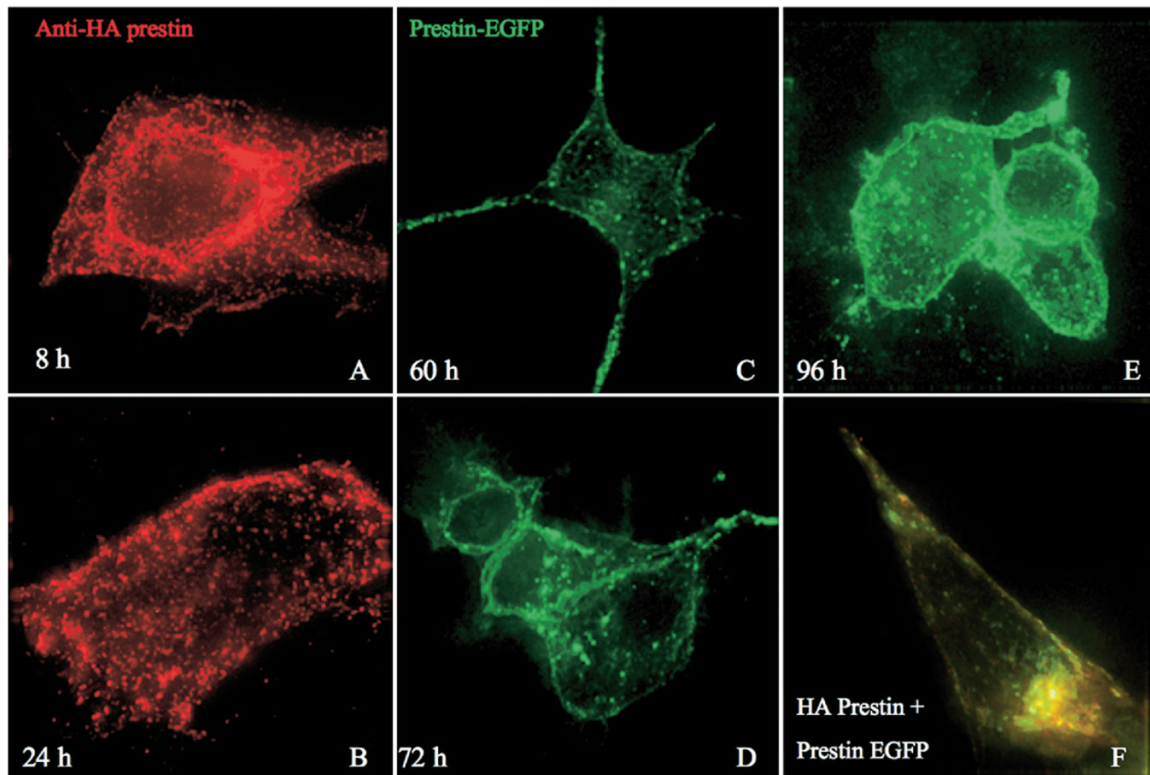


Abbildung 3 – Zeitliche Entwicklung der Verteilung von Prestin in der Zellmembran von HEK-Zellen. Die auf zwei unterschiedliche Arten fluoreszenzmarkierten Prestinmoleküle wurden durch Dekonvolutions-Mikroskopie abgebildet. Die exprimierten Prestinmoleküle (a) befinden sich 24 Stunden nach der Transfektion in der Membran (b), wo sie eine mit der Zeit zunehmend punktierte, inhomogene Verteilung aufweisen (c-f). Grafik aus [38].

2.2 Rasterkraftmikroskop

Ursprünglich entwickelt um Oberflächentopographien zu vermessen, hat sich das Rasterkraftmikroskop (atomic force microscope, AFM) [39] in den Bio-Wissenschaften und speziell in der Biophysik zu einer häufig angewendeten Standardtechnik entwickelt. Mit ihm lassen sich biologische Materialien wie zum Beispiel Zellen oder sogar DNA abbilden [40]. Weiterentwicklungen der Methode machten sie sensibel genug für Kraftspektroskopieanwendungen wie zum Beispiel der Charakterisierung einzelner biologischer Bindungssysteme [41], der Untersuchung von mechanischen Eigenschaften einzelner Zellen [42] oder der Vermessung von spannungsinduzierten Membranbewegungen [43, 44].

2.2.1 Funktionsprinzip

Bei der Rasterkraftmikroskopie wird die untersuchte Probe mechanisch mit Hilfe einer Kraftsonde in Form einer spitzen Nadel, befestigt an einer feinen Blattfeder (Cantilever, vgl. Abbildung 4), abgerastert. Die Positionierung der Feder erfolgt dabei in laterale sowie in vertikale Richtung Ångström-genau durch Piezo-Kristalle. Während des Scanvorgangs wird die Verbiegung des Sensors und die vertikale Position gemessen. Für kleine Auslenkungen Δx verhält sich der Cantilever wie eine Hook'sche Feder. Die Kraft F ist also proportional zu Δx

$$F = k_F \Delta x \quad (5)$$

Die Verbiegung des Kraftsensors wird sehr präzise mit Hilfe des Lichtzeigerprinzips gemessen. Ein Laserstrahl wird auf die Rückseite des Cantilevers fokussiert und von dort in eine segmentierte Photodiode reflektiert (vgl. Abbildung 7). Die Differenzspannung der einzelnen Segmente liefert nach einer entsprechenden Kalibrierung dann die gesuchte Messgröße. Mit Kenntnis der entsprechenden Federkonstante k_F können daher die auftretenden Kräfte berechnet werden. Eine sehr praktikable Methode zur Bestimmung der Federkonstante ist die sogenannte Methode des thermischen Rauschens [45]. Die Eichung des vertikalen Positioniersystem kann über die Interferenzmethode [46] erfolgen.

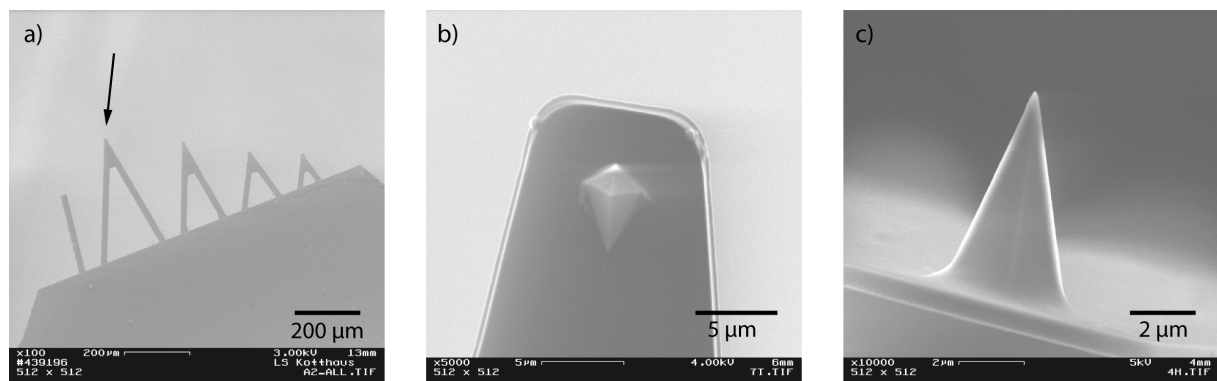


Abbildung 4 – Elektronenmikroskopische Aufnahmen der verwendeten Cantilever. In der Übersichtsaufnahme eines der verwendeten MLCT-Chips (Bruker) ist der genutzte Cantilever markiert. Die beiden Vergrößerungen (b,c) zeigen die Spitze, die die Form einer Pyramide mit rautenförmiger Grundfläche besitzt.

2.3 Patch-Clamp-Technik

Die Elektrophysiologie, die ihre Anfänge ungefähr im 19. Jahrhundert hatte, beschäftigt sich mit der Untersuchung der elektrischen Eigenschaften von biologischem Gewebe und von Zellen. Während mit den relativ groben Messtechniken Mitte des 19. Jahrhunderts Spannungsschwankungen bei Muskelkontraktionen gemessen werden konnten, erreichen moderne Techniken der Elektrophysiologie heutzutage Genauigkeiten, die es erlauben einzelne Ionenkanäle zu vermessen. Ein entscheidender Schritt auf dem Weg zu den präzisen Methoden heutiger Zeit war die Erfindung der sogenannten Spannungsklemme (Voltage-Clamp) durch K.S. Cole und H.J. Curtis gegen Ende der dreißiger Jahre [47]. Diese Technik ermöglicht es, das Potential einzelner Zellen auf einem beliebigen Wert „festzuklemmen“ und die Ionenströme durch die Zellmembran zu vermessen. Als Messelektroden dienen in den intrazellulären Raum eingebrachte Elektroden. Unter anderem A.L. Hodgkin und A.F. Huxley benutzten diese Methode für ihre bahnbrechenden Experimente zur Erforschung des Mechanismus der Erregung und Hemmung der Nervenzellmembranen [48]. Sie erhielten dafür 1963 gemeinsam mit J.C. Eccles den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin. Da die Spannungsklemmmethode nur die Ströme einer ganzen Zelle vermessen kann (Ganzzellableitung), entwickelten E. Neher und B. Sakmann 1976 die sogenannte Patch-Clamp Technik [49], welche es ermöglicht Ströme durch ein kleines Stück Membran (patch engl. für Flecken) zu bestimmen. Hierfür wurde eine Glaspipette mit wenigen Mikrometern großer Öffnung auf die Membran gesetzt und die durch den begrenzten Membranbereich fließenden Ströme aufgezeichnet. Damit war es möglich einzelne Kanalströme zu vermessen (Einzelkanalableitung). Ein entscheidender Punkt bei dieser Prozedur ist das Entstehen eines elektrisch sehr dichten Kontaktes zwischen Zellmembran und Pipette, damit das Stromrauschen ausreichend reduziert wird. Die Größenordnung dieses Abdichtwiderstandes liegt teilweise im Gigaohm-Bereich und wird deswegen als Gigaseal bezeichnet. Für ihre Entdeckungen auf diesem Gebiet erhielten E. Neher und B. Sakmann 1991 ebenfalls den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin.

Die Patch-Clamp Technik ist die wohl meist genutzte Methode in der modernen Elektrophysiologie. Sie findet unter anderem Anwendung in der Pharmakologie, wo mit ihr die Wirkungsweise von bestimmten Wirkstoffen auf die Ionenkanäle untersucht wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine im Folgenden beschriebene Variante dieser Methode angewendet.

2.3.1 Automatisiertes Planares Patch-Clamp

Die beschriebene klassische Patch-Clamp Technik erfordert einen hohen Geräteaufwand und ist zusätzlich zeitaufwändig. Da jede Zelle manuell kontaktiert werden muss, können keine hohen Durchsätze erzielt werden. Eine Variante der Patch-Clamp Technik, die im Jahr 2002 von der Firma Nanion Technologies GmbH (München) entwickelt wurde, nutzt anstatt der Glaspipette einen mikro-strukturierten planaren Glasschip [50, 51]. Ein Mikrometer großes Loch ermöglicht es, mit Hilfe eines angelegten Unterdrucks, Zellen aus einer Zellsuspension automatisch anzusaugen und elektrisch zu kontaktieren. Dazu wird die immobilisierte Zelle Unterdruckpulsen ausgesetzt, die diese öffnen. Nun können Strommessungen im Ganzzellmodus durchgeführt werden. Der Vorteil der beschriebenen Technik ist die Automatisierung des Etablierens eines Gigaseals und

eignet sich hervorragend parallele Messungen vorzunehmen und somit den Durchsatz zu steigern. Die verwendeten Zellsuspensionen müssen allerdings sehr homogen sein, da keine Selektion der gepatchten Zellen durchgeführt werden kann. Ein weiterer Vorteil dieser Variante ist die Möglichkeit nicht-adhärenzte Zellen zu patchen.

2.3.2 Die Zellparameter

Das elektrische Verhalten einer Zelle unter physiologischen Bedingungen wird hauptsächlich durch deren Zellmembran bestimmt. Die Lipiddoppelschicht trennt den extra- und intrazellulären Raum elektrisch und lässt sich als parallele Konstruktion aus einem Kondensator C_M und einem Widerstand R_M^* beschreiben (vgl. Abbildung 5). Ein typischer Wert für die spezifische Membrankapazität liegt bei $0,01 \text{ pF}/\mu\text{m}^2$ [52]. Reine Lipiddoppelschichten sind für Ionen praktisch undurchlässig und wirken wie ein elektrischer Isolator. Aufgrund der in die Zellmembran eingebetteten ionendurchlässigen Transmembranproteine und deren von ihrem Status abhängigen Leitfähigkeit ist der Widerstand der Zellmembran variabel. Die unterschiedlichen Ionenkonzentrationen der beiden durch die Zellmembran getrennten Räume und die selektive Leitfähigkeit der Ionenkanäle bewirkt ein Transmembranpotential, welches mit Hilfe der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung berechnet werden kann.

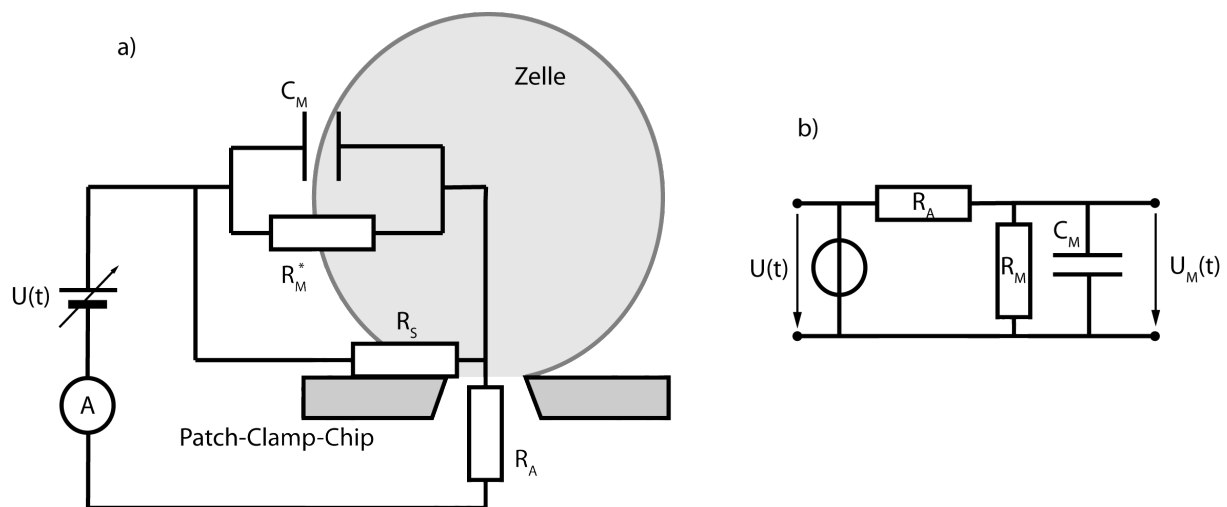


Abbildung 5 – Ersatzschaltbilder einer gepatchten Zelle. Die vereinfachten elektrischen Zusammenhänge einer gepatchten Zelle mit Abdichtwiderstand R_S , Membrankapazität C_M , tatsächlichem Membranwiderstand R_M^* und Zugangswiderstand R_A sind in (a) skizziert. R_M^* und R_S werden in einem nochmals vereinfachten Dreikomponenten-Ersatzschaltbild (b) als Membranwiderstand R_M zusammengefasst.

Mit Hilfe der Patch-Clamp Technik kann man nun Ströme durch die Zellmembran und ihre Ionenkanäle messen. Die Kontaktierung des intrazellulären Raums bei der Ganzzellaufleitung erfolgt dabei über den sogenannten Zugangswiderstand R_A (A steht für access). Der Strom kann dabei aufgrund der nicht idealen Abdichtung zwischen Membran und Patch-Pipette bzw. Patch-Clamp-Chip auch über den Abdichtwiderstand R_S (S steht für seal) in den extrazellulären Raum fließen. Aufgrund der parallelen Anordnung des Membranwiderstandes und des Abdichtwiderstandes können diese

beiden Komponenten in den Messungen nicht getrennt bestimmt werden. Sie werden deswegen im Folgenden unter R_M zusammengefasst und weiterhin als Membranwiderstand bezeichnet.

$$\frac{1}{R_M} = \frac{1}{R_M^*} + \frac{1}{R_s} \quad (6)$$

Die Kapazität, die die Patch-Pipette bzw. der Patch-Clamp-Chip besitzt, wird im Folgenden vernachlässigt, da sie durch eine entsprechende Kompensationsschaltung in der Messapparatur nicht zu den erhaltenen Spannungs- und Stromwerten beiträgt.

Zusammengefasst lässt sich daher das elektrische Verhalten einer im Ganzzellmodus elektrisch kontaktierten Zelle vereinfacht durch ein Ersatzschaltbild mit den drei Hauptkomponenten Membranwiderstand, Membrankapazität und Zugangswiderstand beschreiben.

2.4 Spannungsinduzierte Membranbewegung

Die Zellmembran bildet eine isolierende Schicht zwischen dem Intra- und Extrazellularraum. Sie besitzt eine mechanische Spannung, die unter anderem von der elektrischen Transmembranspannung abhängt. Dies kann aus der aus der Elektrochemie bekannten Lippmanngleichung ([53], 702) abgeleitet werden. Eine experimentelle Verifizierung dieses Zusammenhangs wurde im biologischen Kontext mit Hilfe von Kraftspektroskopiemessungen an Zellmembranen von Zhang et al. im Jahr 2001 vorgenommen [43]. Dabei wurde der Kraftsensor in Form der Cantileverspitze in die Zellmembran eingedrückt und die durch Spannungssprünge induzierte Membranbewegung vermessen.

2.4.1 Mechanische Spannung in einer elektrochemischen Doppelschicht

Die Zellmembran in Form einer Lipiddoppelschicht besitzt je eine Phasengrenze zwischen einer Lipid-Monoschicht und einem Elektrolyt. Jede dieser Phasengrenzen kann man als elektrochemische Doppelschicht bezeichnen. Die Lippmanngleichung verknüpft nun die mechanische Grenzflächenspannung γ mit der Oberflächenladung σ der Doppelschicht.

$$\frac{\partial \gamma}{\partial \Psi_D} = -\sigma \quad (7)$$

Nähert man die Grenzschicht als Plattenkondensator mit der spezifischen Kapazität C_D an, ergibt die Integration der Lippmanngleichung mit der spannungsunabhängigen mechanischen Spannung γ_0

$$\gamma = -\frac{1}{2}C_D\Psi_D^2 + \gamma_0 \quad (8)$$

Um den potentialabhängigen Teil der Grenzflächenspannung zu berechnen müssen also die spezifische Kapazität und das Oberflächenpotential für eine gegebene Ladung bestimmt werden.

Graham entwickelte aus der Gouy-Chapman Theorie eine Gleichung, die den Zusammenhang zwischen Oberflächenladung σ und Oberflächenpotential Ψ_D an einer Doppelschicht beschreibt ([54], 49f).

$$\sigma = \sqrt{8cN_A\epsilon_0\epsilon_w kT} \sinh\left(\frac{e\Psi_D}{2kT}\right) \quad (9)$$

Umformen der Gleichung nach Ψ_D ergibt

$$\Psi_D = \frac{2kT}{ze} \sinh^{-1}\left(\frac{\sigma}{\sqrt{8cN_A\epsilon_0\epsilon_w kT}}\right) \quad (10)$$

Hier steht c für die Konzentration der beteiligten Ionen (als monovalent angenommen), ϵ_0 für die Dielektrizitätskonstante, ϵ_w für die Dielektrizitätskonstante des Wassers, k_B für die Boltzmannkonstante, T für die absolute Temperatur und N_A für die Avogadro-Konstante.

Aus Gleichung (9) lässt sich nun direkt die gesuchte Oberflächenkapazität C_D herleiten. Berücksichtigt man in einer Näherung nur den ersten Term einer Taylorentwicklung des \sinh ergibt sich

$$C_D = \frac{\partial \sigma}{\partial \Psi_D} = \sqrt{\frac{2cN_A \epsilon_0 \epsilon_w e^2}{kT}} = \frac{\epsilon_0 \epsilon_w}{\lambda_D} \quad (11)$$

mit der Debye-Länge für Elektrolyte

$$\lambda_D = \sqrt{\frac{\epsilon_0 \epsilon_w kT}{2cN_A e^2}} \quad (12)$$

Typische Werte für physiologische Elektrolyte ergeben Werte von $C_D \approx 30 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ [43]. Durch Einsetzen der Gleichungen (10) (11) in Gleichung (8) erhält man den gesuchten Ausdruck für die mechanische Grenzflächenspannung (die Variablen T und ϵ_w werden zukünftig als konstant angenommen):

$$\gamma(\sigma, c) = -\frac{\sqrt{(2kT)^3 \epsilon_0 \epsilon_w}}{e} \left(\sqrt{cN_A} \left[\sinh^{-1} \left\{ \frac{\sigma}{\sqrt{8cN_A \epsilon_0 \epsilon_w kT}} \right\} \right]^2 \right) + \gamma_0 \quad (13)$$

2.4.2 Mechanische Spannung in der Zellmembran

Die mechanische Spannung der beiden Grenzschichten einer Zellmembran kann man nun mit Hilfe von Gleichung (13) berechnen und durch Addition die Spannung in der gesamten Zellmembran bestimmen.

Die Oberflächenladung $\sigma_{i,e}$ setzt sich bei einem angelegtem Potential U aus zwei Komponenten zusammen: Der strukturellen $\sigma_{si,se}$ und der kapazitiven Ladungsdichte $\sigma_{ci,ce}$ (die Indizes i,e stehen dabei für intrazellulär und extrazellulär). Da die spezifische Kapazität der Membran c_M mit ca. $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ [52] viel kleiner als der entsprechende Wert für die Grenzschichten ($30 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, siehe oben) ist, kann die kapazitive Ladungsdichte einfach durch $C_M U$ abgeschätzt werden. Es ergibt sich daher:

$$\sigma_{i,e} = \sigma_{si,se} \pm C_M U \quad (14)$$

Insgesamt erhält man mit Gleichung (13) für die mechanische Spannung der Zellmembran T_M

$$T_M = -\gamma(\sigma_{se} - C_M U, c_e) - \gamma(\sigma_{si} + C_M U, c_i) + \gamma_{0e} + \gamma_{0i} \quad (15)$$

2.4.3 Spannungsinduzierte Membran- und Cantileverbewegung

Eine mit der Kraft F in die Zelle und somit auch die Zellmembran eingedrückte Cantileverspitze mit halbem Öffnungswinkel α erfährt unter anderem eine Gegenkraft durch die mechanische Membranspannung T_M . Diese Gegenkraft ist proportional zu $\cos(\alpha)$ und der Länge auf der sie erzeugt wird, welche im Fall der eingedrückten Cantileverspitze dem Kontaktumkreis L entspricht. Der Kontaktumkreis beschreibt hierbei die Linie, an der sich die Membran tangential von der Cantileverspitze trennt. Die entsprechenden geometrischen Zusammenhänge sind in Abbildung 6 am Beispiel einer konischen Cantileverspitze mit dem halben Öffnungswinkel α dargestellt.

Die Änderung der elektrischen Transmembranspannung führt, wie oben beschrieben, zu einer Änderung der mechanischen Spannung. Bei einem Sprung des Haltepotentials der Zelle von U_1 nach U_2 können so die geänderten Kraftverhältnisse am Cantilever gemessen werden.

$$\Delta F = \Delta T_M \cos(\alpha) L \quad (16)$$

wobei man ΔT_M aus Gleichung (15) erhält

$$\Delta T_M = -\gamma(\sigma_{se} - C_M U_2, c_e) - \gamma(\sigma_{si} + C_M U_2, c_i) + \gamma(\sigma_{se} - C_M U_1, c_e) + \gamma(\sigma_{si} + C_M U_1, c_i) \quad (17)$$

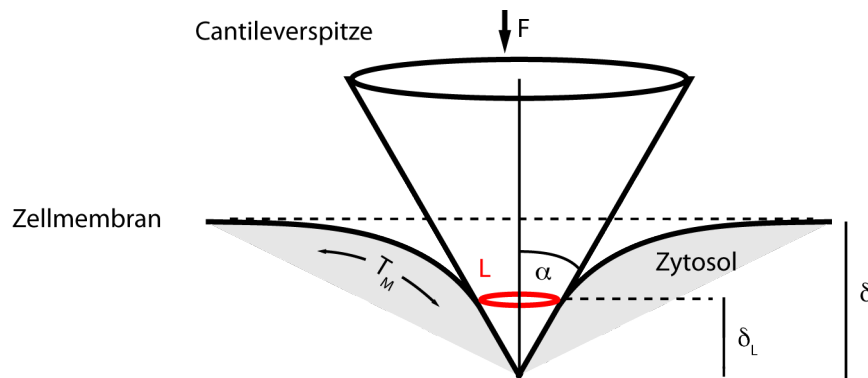


Abbildung 6 – Geometrische Zusammenhänge bei der Eindrückung eines Cantilevers in eine Membran. Die durch die Membranspannung T_M auf den Cantilever (halber Öffnungswinkel α) ausgeübte Kraft ist proportional zum Kontaktumkreis L , an dem sich die Membran tangential von der Spitze trennt und $\cos(\alpha)$. Der tangentielle Charakter des Membran-Spitzen-Kontakts besteht nur bei Vernachlässigung von adhäsiven Kräften. Als Messwert in einem Eindrückungsexperiment steht nur die Eindrücktiefe δ zur Verfügung. Über den Kontaktumkreis bzw. δ_L kann man nur mit Hilfe verschiedener Zellmodelle Aussagen treffen.

2.4.4 Zellmodelle

Die Kraftspektroskopie mittels AFM ist eine etablierte Technik, um die mechanischen Eigenschaften von Zellen und biologischen Materialien zu untersuchen [42]. Dabei werden unterschiedlich geformten Cantileverspitzen in die Probe eingedrückt und Kraft-Abstands Kurven gemessen. Um die gesuchten Messgrößen wie die Elastizität oder die Viskosität aus den Kurven zu bestimmen wurden verschiedene Modelle entwickelt.

Eines der häufigsten genutzten Modelle ist das Hertz-Modell [55, 56]. Die Zelle wird hier vereinfacht als homogener, elastischer Halbraum angenommen, in den die Cantileverspitze eingedrückt wird. Für einen pyramidenförmigen Tip ergibt sich für die wirkende Gegenkraft F in Abhängigkeit von der Eindrücktiefe δ der folgende Zusammenhang [57]

$$F(\delta) = \frac{E \tan(\alpha) \delta^2}{\sqrt{2}(1 - \nu^2)} \quad (18)$$

mit dem die Elastizität beschreibenden Youngs-Modul E und der Poissonzahl ν . Mit der Annahme eines inkompressiblen Zytoplasmas wird die Poissonzahl auf $\nu=0,5$ gesetzt. Der Zusammenhang zwischen gemessener Eindrücktiefe und Kontaktumkreis ist hierbei

$$L = \sqrt{2} \pi \tan(\alpha) \delta \quad (19)$$

Die Kreiszahl π kommt trotz der quadratischen Geometrie in diesem Ausdruck vor, da in der Herleitung ein effektiver Kontaktradius verwendet wurde [57].

Speziell bei längerem Kontakt mit den untersuchten Zellen zeigen diese viskoelastische Eigenschaften. Bei der Beschreibung dieses Verhaltens haben sich linear viskoelastische Modelle wie zum Beispiel das Standard Linear Solid Modell mit einer parallelen Anordnung eines Federelements mit einer seriellen Kombination aus einem Feder- und einem Dämpfungselement als erfolgreich erwiesen [58, 59]. Alle linear viskoelastischen Modelle haben gemeinsam, dass sie für konische und pyramidale Spitzen einen linearen Zusammenhang zwischen Kontaktumkreis L und Eindrücktiefe δ aufweisen [60, 61].

$$\delta \propto L \quad (20)$$

Dies gilt allerdings nur solange der Kontaktumkreis monoton mit der Eindrückung steigt.

Ein letztes hier kurz vorgestelltes Zellmodell ist das sogenannte Tropfenmodell [62, 63]. Die Zelle wird hier als Tropfen angenommen mit einer unter Spannung stehender Grenzfläche zwischen zwei Halbräumen unterschiedlichen Drucks. Bei Eindrückung einer pyramidenförmigen Spitze ergibt sich folgender Zusammenhang zwischen Kraft und Kontaktumkreis

$$F = \frac{T_M L^2}{2\pi R} + T_M \cos(\alpha) L \quad (21)$$

Der Zusammenhang zwischen Kontaktumkreis und Eindrücktiefe ist hier komplizierter

$$\delta = \frac{L}{8} \cot(\alpha) + R - \sqrt{R^2 - (L/8)^2} \quad (22)$$

Für größere Zellen und kleine Eindrücktiefen $R \gg L/8$ kann dieser Ausdruck allerdings auf den linearen Term reduziert werden.

$$\delta = \frac{L}{8} \cot(\alpha) \quad (23)$$

Die beschriebenen Modelle liefern alle einen Zusammenhang zwischen der Eindrücktiefe und der Eindrückkraft, welcher die beiden direkt zugänglichen Parameter der kraftspektroskopischen Messungen verknüpft. Im Hinblick auf die Anwendung der Modelle für die Vermessung der spannungsinduzierten Membranbewegung sind die Zusammenhänge der gemessenen Parameter mit dem Kontaktumkreis interessant. Wie oben beschrieben, ist die auf den Cantilever übertragene Kraft aufgrund einer Änderung der mechanischen Membranspannung proportional zum Kontaktumkreis der Eindrückung.

Die Verwendung von spitzen Cantilevertips hat den Nachteil, dass bei zu hohen Eindrückkräften die Deformation teilweise nicht mehr im Bereich linearer Materialeigenschaften liegt. Bei zu hohen Kräften kann zudem die Zellmembran beschädigt werden. Der Vorteil gegenüber kugelförmigen Messsonden liegt in der Möglichkeit, Eigenschaften der Zellmembran mit hoher lokaler Präzision zu untersuchen.

3 Methoden

3.1 Kombiniertes Planares Patch-Clamp-AFM

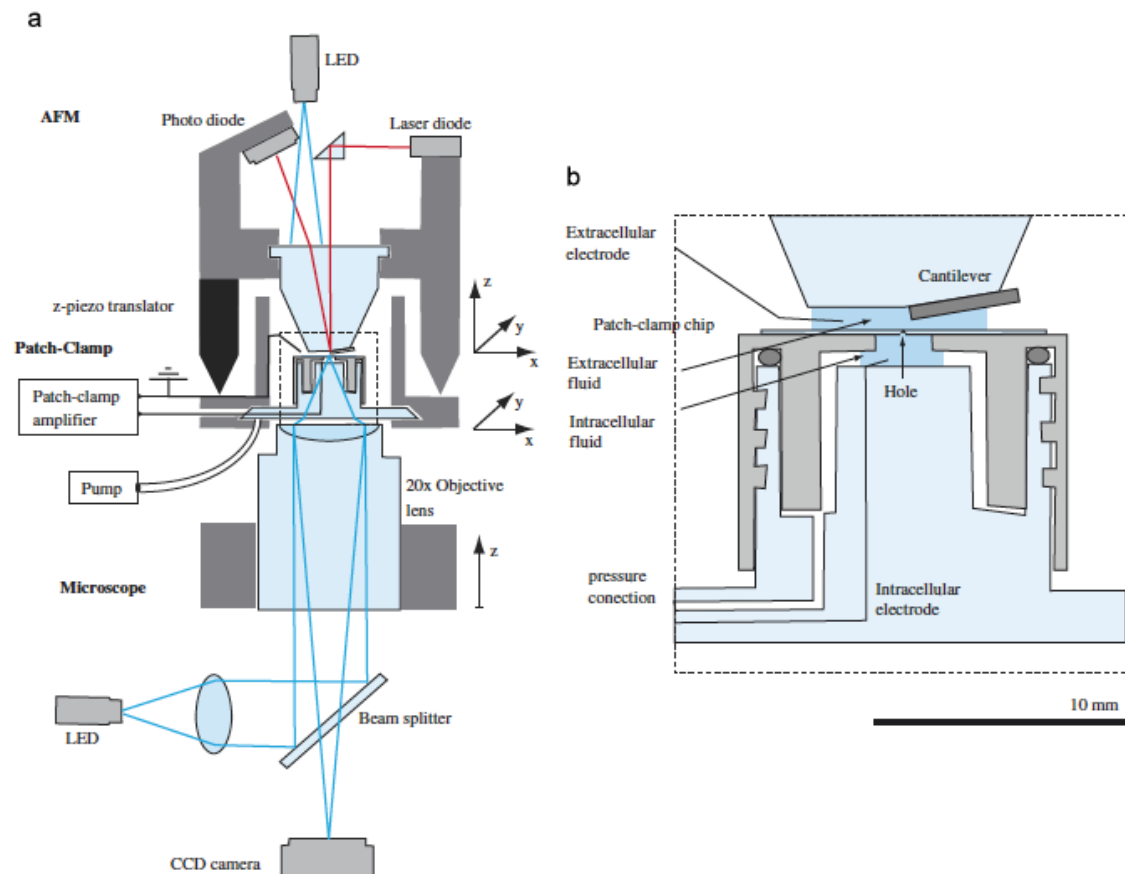


Abbildung 7 – Planares-Patch-Clamp AFM. Das verwendete Setup besteht aus drei Haupteinheiten (a): einem AFM, einem planaren Patch-Clamp-System und einem invertiertem Mikroskop. Der in (a) markierte Bereich ist in (b) vergrößert dargestellt. Die intra- und extrazelluläre Lösung wird jeweils mit einer chloridierten Silberelektrode (Ag/AgCl) elektrisch kontaktiert. Mit Hilfe eines variablen Drucks können Zellen auf dem Loch immobilisiert und anschließend mit dem Cantilever mechanisch kontaktiert werden. Grafik aus [64].

Möchte man verschiedene physikalische Eigenschaften biologischer Systeme untersuchen die gekoppelt sind, müssen die entsprechenden Parameter simultan gemessen werden. Bei den weiter beschriebenen Beispielen der spannungsinduzierten Membranbewegung bzw. des Moleküls Prestin handelt es sich um Systeme, bei denen elektrische und mechanische Eigenschaften miteinander verknüpft sind. Für die Messung der elektrischen Parameter eignet sich die oben beschriebene Patch-Clamp-Technik. Die Bestimmung der mechanischen Eigenschaften kann mit Hilfe der Kraftspektroskopie mittels AFM erfolgen. Entsprechende Kombinationen dieser beiden Techniken sind bereits öfter in Experimenten angewendet worden [43, 65]. Hierbei kam immer das klassische Patch-Clamp Verfahren mit Glaspipetten zum Einsatz. Ein Setup, das stattdessen den planaren Ansatz unter Verwendung eines Glaschips einbindet, wurde am Lehrstuhl Gaub entwickelt [64]. Es besteht aus der Kombination eines selbstgebauten AFM-Kopfs, eines planaren Patch-Clamp Aufbaus basierend auf dem kommerziell vertriebenen „Port-a-patch“ der Firma Nanion Technologies GmbH

(München) [50] und eines Lichtmikroskops. Eine Skizze des Aufbaus ist in Abbildung 7 zu sehen. Das Setup zeichnet sich aufgrund der kompakten Bauweise und der Verwendung des planaren PC-Chips durch ein geringes mechanisches und elektrisches Rauschen aus. Die Steuerung der einzelnen auch autonom funktionsfähigen Teilsysteme findet zentral über ein Igor Experiment mittels eines Controllers von Asylum Research (Santa Barbara, USA) statt. Auf diese Weise können die einzelnen Messkanäle optimal synchronisiert werden.

3.2 Messungen und Messwerte

Die Experimente wurden durchgeführt, indem der Cantilever unter optischer Kontrolle mit der Spitze über der immobilisierten Zelle positioniert wurde. Die Apertur und der dazugehörige Kanal durch den Glaschip konnten unter dem Lichtmikroskop nicht scharf aufgelöst werden und erschienen als diffuser, runter Schatten (vgl. Abbildung 8). Bei schlechten optischen Verhältnissen konnte die genaue Positionierung auch zusätzlich noch mit Hilfe der Auslenkung des Cantilevers vorgenommen werden. Dazu wurde die Zelle grob mit minimaler Kraft kontaktiert und manuell mit Hilfe von Mikrometerschrauben die Stelle der maximalen Auslenkung aufgesucht. Nach der Positionierung konnten nun parallel Kraft-Abstands- und Strom-Spannungskurven gemessen werden. Es war dabei möglich, jeweils einen Parameter der Messpaare zu fixieren oder durch ein beliebiges Parameterprotokoll zu variieren. Theoretisch ist die Steuerung und Bestimmung des Drucks der Patch-Clamp-Pumpe auch möglich, was aber in den hier durchgeführten Versuchen keine Verwendung fand.

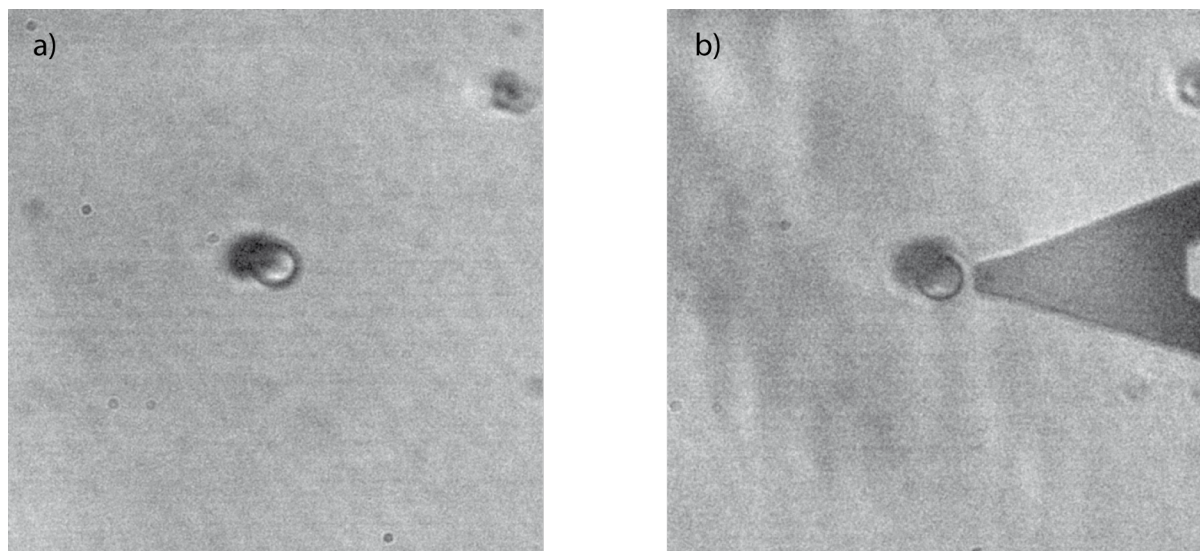


Abbildung 8 – Immobilisierte Zelle und Cantilever. Die mikrometergroße Apertur kann optisch nicht scharf aufgelöst werden und erscheint in Form eines dunklen Schattens (a). Die darauf immobilisierte Zelle ist in ihrer runden Form gut zu erkennen. Die Spitze des Cantilevers kann unter dem Lichtmikroskop in Form eines dunklen Punktes am Ende des Cantilevers aufgelöst werden (b).

3.2.1 Messung der Eindrückkraft und Eindrücktiefe

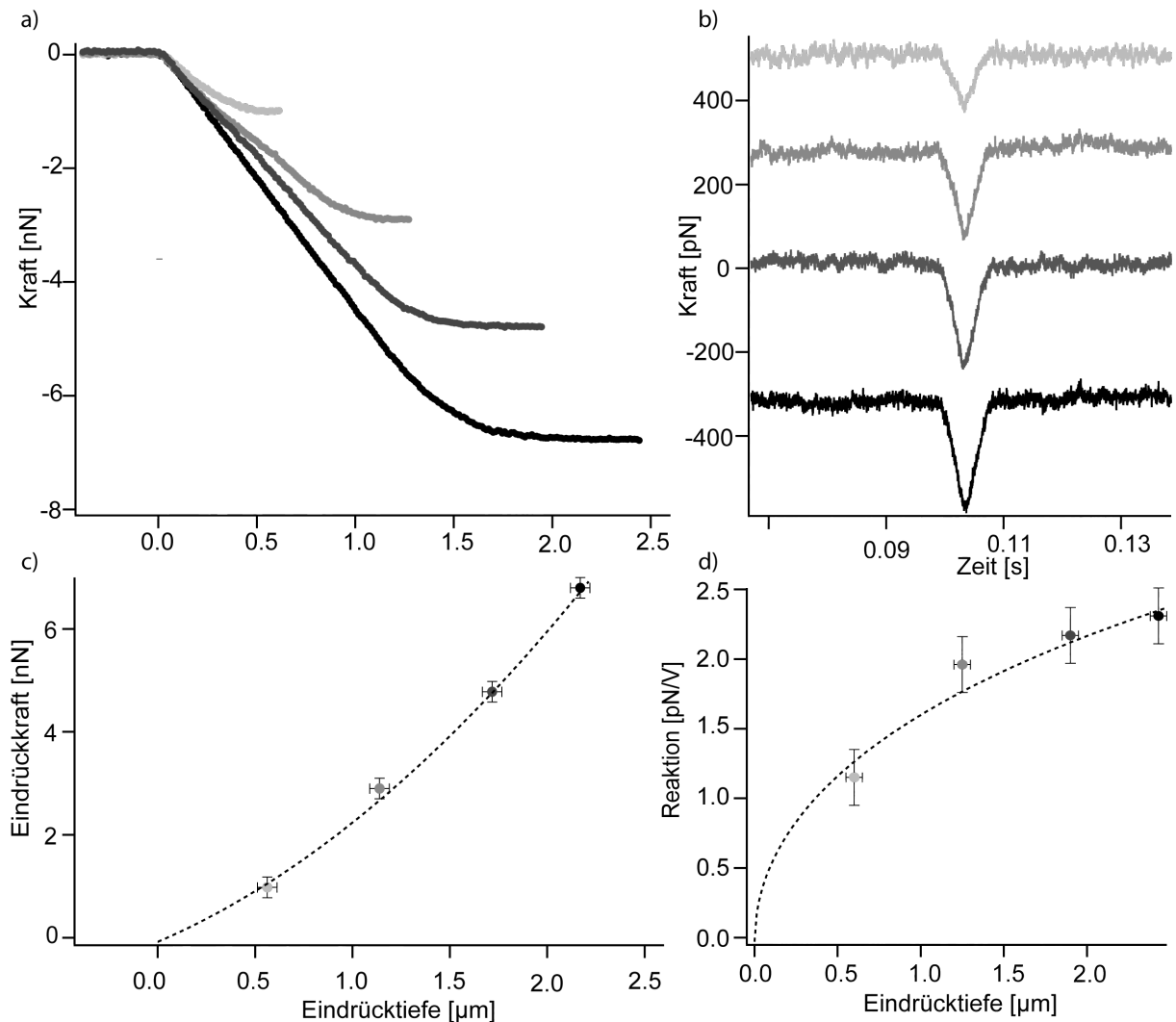


Abbildung 9 – Messkurven bei verschiedenen Eindrückkräften. Aus den Kraft-Abstands-Kurven (a) und den Kraftkurven der Reaktionen des Cantilevers auf einen Spannungspuls (b) lassen sich Eindrücktiefe und die Reaktion für eine bestimmte Eindrückkraft ermitteln. Die Auftragung dieser Größen gegeneinander (c,d) kann benutzt werden, um bestimmte Zellmodelle bzw. Modelle der Reaktionsentwicklung zu testen (die gestrichelten Linien sind Fits einer quadratischen (c) und wurzelförmigen (d) Funktion an die Daten).

Die Cantileverspitze wird mit einer vordefinierten Kraft in die immobilisierte Zelle eingedrückt. Dabei wird der Piezo mit Hilfe einer Proportional-Integral-Regelung (PI-Regelung) angesteuert, die auf das Cantilever Signal triggert. Das Verwenden einer PI-Regelung anstatt einer Rampe führt zu einer variablen Geschwindigkeit während der Annäherung und des Eindrückens. Die so gemessenen Kraft-Position-Kurven zeigen deshalb ein viskoelastisches Verhalten der Zelle (vgl. Abbildung 9). Der Kontaktpunkt mit der Zelle wird mit Hilfe eines halbautomatischen Verfahrens bestimmt. Zwei Bereiche eines Intervalls werden linear gefittet und die Differenz der beiden Steigungen gebildet. Dieses Intervall wird nun in iterativ verkleinerten Bereichen über der Kraft-Abstands Kurve verschoben, wobei das Zentrum des nächsten Bereichs immer die Stelle der maximalen Differenz ist. Der so gefundene Kontaktbereich wird manuell korrigiert. Die Differenzen der Positions- und Kraftwerte im Kontakt- und Endpunkt werden gebildet und somit die Eindrückkraft und Eindrücktiefe bestimmt. Die Verbiegung des

Cantilevers ist vor allem bei hohen Eindrückkräften nicht zu vernachlässigen und muss vom erhaltenen Wert noch abgezogen werden.

Nach jeder einzelnen Messung der Antwort auf die Anregungspulse wird der Cantilever wieder in eine Entfernung zurückgezogen, in der die Spitze keinen Kontakt mehr zur Zelle hat. In aufeinanderfolgenden Messungen kann nun zum Beispiel die Eindrückkraft variiert werden und so mit Hilfe der erhaltenen Messwertabhängigkeiten bestimmte Zellmodelle getestet werden (vgl. Abbildung 9).

3.2.2 Messung relevanter Zellparameter

Im Laufe der Zeit sind verschiedene Methoden entwickelt worden, um aus den Messgrößen Spannung und Strom, die die Patch-Clamp Methode liefert, die passiven Zellparameter der gepatchten Zelle zu ermitteln (vgl. Abbildung 5). Dazu werden verschiedene Formen von Kommandospannungen genutzt. Speziell eine sehr genaue Messung der Zellkapazität kann Aufschluss über interessante Vorgänge in Zellen, wie zum Beispiel Endo- und Exozytose geben da sich hierbei die Membranoberfläche ändert. Entsprechende Messmethoden sind zum Beispiel:

- Benutzung des Schaltkreises zur Kapazitätskompensation [66]
- Spannungssprünge und die Analyse der Zeitkonstante der entstehenden Stromtransienten [67]
- Messung der Stromantwort auf eine sinusförmige Anregung in einem bestimmten Phasenwinkel (Lock-in-Technik, [67])

Es hat sich mit der Zeit die später beschriebene Lock-in-Technik durchgesetzt, da sie eine sehr gute Zeitauflösungen sowie ein hohes Signal-Rausch-Verhältnis bietet. Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Spannungsrampenmethode ermöglicht es theoretisch, in einer im Vergleich zur Lock-in-Technik stark verkürzten Zeit die Zellparameter und im Speziellen die nichtlineare Kapazität zu vermessen. Dies geschieht allerdings, wie im Ergebnisteil beschrieben wird, auf Kosten der Genauigkeit der Messwerte.

Zur Messung der Zellparameter wird der entsprechende Spannungspuls über den Eingang für externe Stimuli am EPC-10 Verstärker eingespeist. Das angelegte Signal wird dort intern mit einem Skalierungsfaktor multipliziert und an die Probe angelegt. Es stellte sich heraus, dass ein relativ großer Offset von bis zu 4mV auf dem Anschluss vorhanden ist. Da der Offset am geringsten für niedrige Skalierungsfaktoren ist, wurde er auf 0,1 gestellt und die Spannungspulse zehnfach verstärkt eingespeist.

Die an der Probe gemessenen Werte werden wiederum über einen Strom- und Spannungsmonitorausgang ausgelesen und im Igor-Steuerexperiment verarbeitet. Der Patch-Clampverstärker filtert das Strommesssignal mit zwei hintereinandergeschalteten Besselfiltern (10kHz und 2,9kHz). Das am Strommonitor anliegende Signal ist bereits durch den ersten dieser beiden Filter geglättet worden. Dies ist insbesondere bei der Auswertung der Signale zu beachten, da hierdurch eine zusätzliche Phase zwischen Strom- und Spannungssignal entsteht.

Die Lock-in-Technik

Bei der Lock-in-Technik wird die Stromantwort auf eine sinusförmige Kommandospannung analysiert (vgl. Abbildung 10). Ursprünglich wurden dafür analoge

Lock-in Verstärker benutzt, die es ermöglichen den Strom in einem bestimmten Phasenwinkel zu untersuchen und außerdem ein sehr hohes Signal-Rausch-Verhältnis bieten. Man kann den Phasenwinkel zum Beispiel so einstellen, dass das Ausgangssignal proportional zur Kapazität der Zelle ist [52]. Eine Messung der Ausgangssignale bei zwei um 90° verschobenen Phasenwinkeln ermöglicht die Bestimmung der Admittanz Y bzw. der Impedanz Z des untersuchten Schaltkreises.

$$Y = \frac{I}{U} e^{i(\varphi_I - \varphi_U)} = A + iB \quad (24)$$

Für das in **Abbildung 5** gezeigte Ersatzschaltbild einer gepatchten Zelle ergibt sich für die Admittanz unter Verwendung der Konduktanzen anstelle der Widerstände

$$Y(\omega) = \frac{G_A (G_M + i\omega C_M)}{G_A + G_M + i\omega C_M} \quad (25)$$

Die Messung der komplexen Admittanz bei einer Frequenz ω liefert nur zwei unabhängige Messwerte wie zum Beispiel den Real- und Imaginärteil und ist deswegen nicht geeignet die drei Komponenten des Ersatzschaltbildes zu erhalten. Eine zusätzliche Messung zum Beispiel der Gleichstromkonduktanz b ist dafür notwendig.

$$b = \frac{1}{R_A + R_M} \quad (26)$$

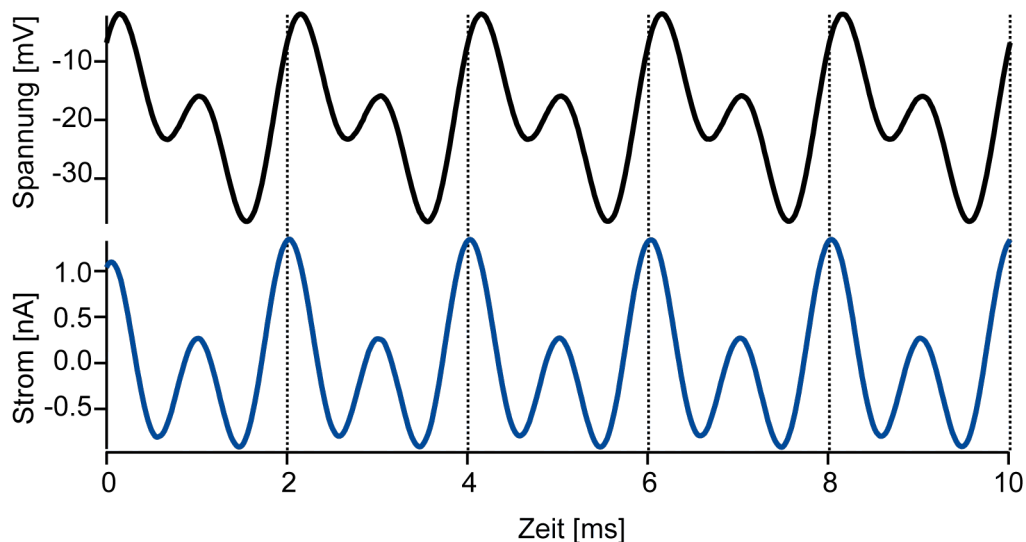


Abbildung 10 – Spannungs- und Stromkurven der Lock-in-Technik. Der an eine Zelle (vgl. Abbildung 5) angelegte Spannungspuls, bestehend aus zwei Sinuspulsen mit den Frequenzen 500 Hz und 1000 Hz mit einer Amplitude von jeweils 10 mV, ruft eine Stromantwort hervor, die unter anderem phasenverschoben ist. Die mit Hilfe der Lock-in-Technik analysierten Admittanzen liefern die Zellparameter $G_A = 0,1 \mu S$ ($R_A = 10 M\Omega$), $G_M = 1 nS$ ($R_M = 1 G\Omega$) und $C_M = 20 pF$.

Durch geschicktes Umformen [67] der Gleichungen (24) und (25) erhält man für die gesuchten Größen

$$G_A = \frac{A^2 + B^2 - Ab}{A - b} \quad (27)$$

$$G_M = \frac{bG_A}{G_A - b} \quad (28)$$

$$C_M = \frac{G_A^2(A - b)}{\omega B(G_A - b)} \quad (29)$$

Die Messung des Gleichstromleitwertes kann man umgehen, indem man die Admittanz bei verschiedenen Frequenzen ω_1 und ω_2 misst. Man erhält dadurch vier unabhängige Messwerte A_1, B_1 , und A_2, B_2 :

$$Y(\omega_1) = A_1 + iB_1 \quad Y(\omega_2) = A_2 + iB_2 \quad (30)$$

Da die Leitwerte der Widerstände und des Stromkreises nicht frequenzabhängig sind, daher gilt:

$$G_A(\omega_1) = G_A(\omega_2) \quad (31)$$

$$b(\omega_1) = b(\omega_2) \quad (32)$$

kann man den Ausdruck aus Gleichung (27) für beide Frequenzen gleichsetzen und erhält damit

$$\frac{A_1^2 + B_1^2 - A_1 b}{A_1 - b} = \frac{A_2^2 + B_2^2 - A_2 b}{A_2 - b} \quad (33)$$

und nach einer Umformung

$$b^2 + \frac{A_1^2 + B_1^2 - A_2^2 - B_2^2}{A_2 - A_1} b + \frac{A_1(A_2^2 - B_2^2) - A_2(A_1^2 + B_1^2)}{A_2 - A_1} = 0 \quad (34)$$

Den gesuchten Wert für den Gleichstromleitwert erhält man durch die Lösung der quadratischen Gleichung mit Hilfe der p-q-Formel

$$p = \frac{A_1^2 + B_1^2 - A_2^2 - B_2^2}{A_2 - A_1} \quad (35)$$

$$q = \frac{A_1(A_2^2 - B_2^2) - A_2(A_1^2 + B_1^2)}{A_2 - A_1} \quad (36)$$

$$b = -\frac{p}{2} - \sqrt{\frac{p^2}{4} - q} \quad (37)$$

Hat man die Admittanz bei den verschiedenen Frequenzen gemessen und die Real- und Imaginärteile A_1 , A_2 , B_1 , B_2 bestimmt, kann man R_A , R_M , C_M daraus durch sukzessive
(37)(27)(28)(29)

Anwendung der Gleichungen bestimmen.

Phasenbestimmung mit einem virtuellen Lock-in-Verfahren

Um die Admittanz aus dem angelegten Spannungspuls und der Stromantwort zu erhalten, kann man mit Hilfe einer komplexen Fouriertransformation die Amplitude und Phase der Signale bestimmen. Eine derart simple Implementierung in dem verwendeten Igor-Steuerexperiment hat sich als numerisch instabil erwiesen. Eine Alternative ist die Nutzung eines virtuellen bzw. digitalen Lock-in-Verfahrens, was mehr oder weniger den ursprünglich analogen Weg nachbildet.

Ein Lock-in-Verstärker kann benutzt werden, um aus einem Signal eine bestimmte Frequenzkomponente zu extrahieren, er stellt also einen sehr schmalen Bandpassfilter dar. Dies geschieht, indem das Signal mit einem Referenzsignal in Form eines Sinus gewünschter Frequenz multipliziert und dann mit einem Tiefpass gefiltert wird.

Diesen Vorgang kann man mathematisch beleuchten, indem man eine einzelne Frequenzkomponente $S_i \sin(\omega_i t + \varphi_i)$ eines Signals betrachtet. Multipliziert mit dem Referenzsignal $S_{ref} \sin(\omega_{ref} t + \varphi_{ref})$ ergibt sich

$$S_0(t) = S_{ref} S_i \sin(\omega_{ref} t + \varphi_{ref}) \sin(\omega_i t + \varphi_i) \quad (38)$$

und mit Hilfe der trigonometrischen Additionstheoreme lässt sich dies umformen zu

$$S_0(t) = \frac{1}{2} S_{ref} S_i \cos([\omega_i - \omega_{ref}]t + \varphi_i - \varphi_{ref}) - \frac{1}{2} S_{ref} S_i \cos([\omega_i + \omega_{ref}]t + \varphi_i + \varphi_{ref}) \quad (39)$$

Bildet man nun den Mittelwert von $S_0(t)$, was einer Filterung mit einem Tiefpass entspricht, ist das Ergebnis nur von Null verschieden, falls ω_i gleich ω_{ref} ist. Das durch den Lock-in-Filter prozessierte Signal ist nun zeitlich konstant und proportional zu $\cos(\varphi_i - \varphi_{ref})$ und S_i

$$S_{0f}(t) = S_{0f} = \frac{1}{2} S_{ref} S_i \cos(\varphi_i - \varphi_{ref}) \quad (40)$$

Mit einem um $\pi/2$ phasenverschobenen Referenzsignal $S_{ref} \sin(\omega_{ref} t + \varphi_{ref} + \pi/2)$ erhält man

$$S_{\pi/2}(t) = S_{\pi/2} = \frac{1}{2} S_{ref} S_i \sin(\varphi_i - \varphi_{ref}) \quad (41)$$

Mit Hilfe von $S_{\pi/2}$ und S_0 errechnet man den Phasenwinkel zwischen Referenzsignal und der Signalkomponente

$$\varphi_i - \varphi_{ref} = \tan^{-1}\left(\frac{S_{\pi/2}}{S_0}\right) \quad (42)$$

sowie einen zur Amplitude der Signalkomponente proportionalen Term

$$S_i \propto \sqrt{S_{\pi/2}^2 + S_0^2} \quad (43)$$

Das beschriebene Verfahren wurde in Igor implementieren und erwies sich als sehr robust.

Die Admittanz $Y(\omega)$ einer gepatchten Zelle erhält man indem man sowohl die sinusförmige Kommandospannung als auch die Stromantwort mit demselben Referenzsignal vergleicht. Man erhält Werte, die proportional zu U_ω und I_ω sind sowie die Phasendifferenzen $\varphi_{U_\omega} - \varphi_{ref}$ und $\varphi_{I_\omega} - \varphi_{ref}$ und damit

$$Y(\omega) = \frac{I_\omega}{U_\omega} e^{i(\varphi_{I_\omega} - \varphi_{U_\omega})} = A_\omega + B_\omega i \quad (44)$$

Die entsprechenden Real- und Imaginärwerte ergeben sich durch

$$A_\omega = \frac{I_\omega}{U_\omega} \cos(\varphi_{I_\omega} - \varphi_{U_\omega}) \quad (45)$$

und

$$B_\omega = \frac{I_\omega}{U_\omega} \sin(\varphi_{I_\omega} - \varphi_{U_\omega}) \quad (46)$$

Implementierung der Lock-in-Technik

Die Lock-in-Technik ist in Form einer Igor-Prozedur im Igor-Steuerexperiment implementiert. Die verwendeten Frequenzen der Kommandospannungen dürfen nicht zu hoch sein, da sonst der Verstärkerfilter die Amplituden zu sehr beeinflusst. Als vernünftig haben sich Werte im Bereich von einigen 100 Hz bis zu 1,5 kHz herausgestellt. Da die Daten mit einer Abtastrate von 50 kHz gemessen werden, bieten sich 500 Hz und 1000 Hz als Lock-in-Frequenzen an, da für sie die Punkte pro Zyklus ganzzahlig sind (50 bzw. 100). Die Amplitude wurde auf 10 mV festgelegt (quadratisches Mittel), damit bei einer vernünftigen Größe der gemessenen Ströme der Bereich der überspannten Spannung möglichst klein war. Dadurch werden Fehler bei

den Messungen der spannungsabhängigen Parameter minimiert. Eine Bestimmung der Zellparameter über einen Spannungsbereich erfolgt mit Hilfe einer Spannungstreppe, die den Bereich von -133 mV bis 20 mV mit einer Stufenhöhe von 8,1 mV in insgesamt einer Sekunde abtastet. Die Stufen haben dabei jeweils eine Länge von 50 ms von denen die ersten 20 ms aufgrund der dort überlagerten Stromtransienten aus dem Spannungssprung nicht in der Analyse berücksichtigt werden.

Wie oben bereits beschrieben, kann es aufgrund von verschiedenen Faktoren dem vorgeschalteten Filter des Stromsignals oder einer verschiedenartiger spezifischer internen Verarbeitung und Signalweiterleitung zu einer Phasendifferenz zwischen Strom- und Spannungssignal kommen. Um diese zu ermitteln wird ein ohmscher Widerstand als Probe an den Patch-Clamp-Verstärker angeschlossen. Strom und Spannung sind hier genau in Phase. Die Modelzelle MC-10 der Firma HEKA in der Einstellung der offenen Pipette stellt einen Widerstand von 10MΩ zur Verfügung. Nun legt man den Sinuspuls mit den späteren Messfrequenzen an und bestimmt jeweils die Phasendifferenz, die später intern von den Signalen abgezogen wird. Bei 500 Hz lagen die gemessenen Werte zwischen $0,030 \pi$ und $0,037 \pi$ und bei 1000 Hz zwischen $0,059 \pi$ und $0,074 \pi$.

Die Spannungsrampenmethode

Um möglichst simultan die Reaktion des Cantilevers auf Spannungsänderungen und die spannungsabhängige Kapazität der Zellen zu vermessen, kann man eine Spannungsrampe benutzen. Dies hat den Vorteil gegenüber einer Treppenfunktion, dass die Werte kontinuierlich bei zusätzlich geringerem zeitlichen Aufwand abgelaufen werden.

Um aus den Strommesswerten die passiven Zellparameter zu erhalten ist es möglich, die theoretisch erwartete Stromantwort an die Messwerte zu fitten. Die theoretische Lösung des Problems wurde über den Umweg der Membranspannung $U_M(t)$ ermittelt. Mit Hilfe des Ersatzschaltbildes in Abbildung 5 ergibt sich die Differentialgleichung

$$U(t) = U' t = \frac{C_M}{G_A} \dot{U}_M(t) + \frac{G_M + G_A}{G_A} U_M(t) \quad (47)$$

deren Lösung mit Hilfe der Laplace-Transformation (Rechnung 2) gefunden wurde:

$$U_M(t) = \frac{U' C_M R_A R_M^2}{(R_A + R_M)^2} \left(e^{-\frac{R_A + R_M}{R_A R_M C_M} t} - 1 \right) + \frac{R_M U'}{R_A + R_M} t \quad (48)$$

Für die messbare Stromantwort wurde folgende Formel ermittelt:

$$I(t) = I_A(t) = \frac{U(t) - U_M(t)}{R_A} = \frac{U' C_M R_M^2}{(R_A + R_M)^2} \left(1 - e^{-\frac{R_A + R_M}{R_A R_M C_M} t} \right) + \frac{U'}{R_A + R_M} t \quad (49)$$

Da bei gepatchten Zellen im Gigaohm-Bereich immer $R_M \gg R_A$ gilt, besteht die Stromantwort folglich aus einem transienten Exponentialteil mit der Zeitkonstante $\tau =$

$C_M R_A$ und einem linearen Teil, der der Gleichstromantwort des Ersatzschaltbildes entspricht (vgl. Abbildung 12).

Dieses Ergebnis könnte man, ähnlich wie bei der Methode der Spannungssprünge, nutzen, um die passiven Zellparameter zu erhalten. Die Methode ist allerdings nicht geeignet, falls die gesuchten Parameter eine Abhängigkeit von der Spannung haben.

Implementierung der Spannungsrampenmethode

Ebenso wie bei der Lock-in-Technik musste bei der Methode der Spannungsrampe die Zeitdifferenz der beiden Signale berücksichtigt werden. Hierzu wurde ein Spannungssprung angelegt, der Zeitunterschied der Strom- und Spannungsspur ermittelt und intern bei der Analyse berücksichtigt. Der gemessene Werte lag bei ca. 30 μ s (Besselfilterung mit 10kHz).

In den Experimenten wurden zwei verschiedene Spannungsrampen angewendet, die unterschiedlich große Spannungsbereiche abdecken (vgl. Abbildung 12). Der überdeckte Spannungsbereich beträgt 117 mV bzw. 223 mV, der in Form einer linearen Auf- und Abwärtsrampe in insgesamt 8,8 ms abgefahren wird (-185 mV bis 47 mV bzw. -111 mV bis 5 mV). Im Folgenden werden die Pulse als Seal-Puls (117 mV) und als NLC-Puls (223 mV) bezeichnet. Der komplette Spannungspuls dauert eine halbe Sekunde und besteht aus drei äquidistant aufeinanderfolgenden Rampen. Die Bereiche der Rampen wurden so gewählt, dass sie den zu erwarteten Arbeitsbereich von Prestin in etwa überdecken. Es muss hierbei beachtet werden, dass dieser Bereich variabel ist und wie im oben beschrieben von äußeren Faktoren wie Druck, Vorspannung und Temperatur abhängt.

Während der Messungen an vielen Zellen hat sich gezeigt, dass der breitere Spannungspuls von 223 mV eine negative Auswirkung auf die Entwicklung des Abdichtwiderstands hat. Bei mehrmaliger Anwendung kam es oft zu einem Sealbruch, der weitere Messungen unmöglich machte. Die Zellparameter wurden aus diesem Grund routinemäßig mit dem schmalen Puls vermessen, der breitere Spannungspuls kam nur vereinzelt zur Anwendung. Das Problem des 117 mV Pulses ist allerdings, dass der Arbeitsbereich von Prestin nicht komplett vermessen wird bzw. nur dann, wenn der Startpunkt optimal gewählt wird. Da sich der optimale Bereich während der Messung aber unbemerkt ändern kann, kommt es zu den in Abbildung 20 gezeigten Problemen. Als guter Kompromiss ermöglicht der kleine Puls aber die wiederholte Bestimmung der passiven Zellparameter R_A , R_M und C_M bei zeitlich ausgedehnten Experimenten.

Berechnung der Stromantwort

Die Stromantwort auf einen beliebigen Spannungspuls kann für den in Abbildung 5 gezeigten Stromkreis auch mit Hilfe eines numerischen Verfahrens berechnet bzw. simuliert werden. Eine einfache Methode hierzu ist das eulersche Polygonzugverfahren. Dieses Verfahren kann benutzt werden, um die Spannung an der Membran in diskreten Schritten mit Hilfe der Differentialgleichung (47) zu berechnen.

$$\dot{U}_M(t) = f(t, U_M(t)) \quad (50)$$

In Abständen der Diskretisierungsschrittweite Δt können nun die Werte für $U_M(t)$ an den Stellen $t_i = t_0 + i\Delta t$ abgeschätzt werden:

$$U_M(t_{i+1}) = U_M(t_i) + f(t_i, U_M(t_i))\Delta t \quad (51)$$

Auf diese Weise erhält man schrittweise eine numerische Lösung der Differentialgleichung (50).

Bei einer impliziten Zeitabhängigkeit der Membrankapazität $C(U)$ (über die Spannungsabhängigkeit und deren explizite Zeitabhängigkeit) erhält man konkret (siehe Anhang Rechnung 1)

$$\dot{U}_M(t) = \frac{U(t)G_A - U_M(t)(G_A + G_M)}{C_M + \frac{\partial C_M}{\partial U} U_M(t)} \quad (52)$$

Den Strom an den diskreten Punkten t_i erhält man über die Gleichung

$$I(t_i) = \frac{U(t_i) - U_M(t_i)}{R_A} \quad (53)$$

Zu einem gegebenen Spannungspuls $U(t)$ kann mit diesem Verfahren bei gegebenen Parametern R_A , R_M , C_M mit Hilfe der Gleichungen (52)(53) die Stromantwort $I(t)$ des Ersatzschaltbildes aus Abbildung 5 berechnet werden. In Gleichung (52) ist dabei die explizite Abhängigkeit der Membrankapazität von der Spannung berücksichtigt worden.

Der Hooke-Jeeves-Algorithmus

Die Parameter der gepatchten Zelle im Ganzzellmodus kann man ebenfalls mit Hilfe der Methoden zur Lösung von Optimierungsproblemen in Kombination mit der numerischen Berechnung der Stromantwort bestimmen. Dabei kann theoretisch ein beliebiger Spannungspuls verwendet werden.

Optimierungsprobleme beschäftigen sich mit dem Suchen von optimalen Parametern eines Systems, um eine bestimmte Zielfunktion zu minimieren. Beim sogenannten Fitten von Funktionen an Messpunkte handelt es sich zum Beispiel um ein typisches Optimierungsproblem. Im Fall der gepatchten Zelle sind die Zellparameter gesucht, die optimal zu der angelegten Spannung und der gemessenen Stromantwort passen. Die zu minimierende Zielfunktion ist hier also die Differenz der entsprechenden numerisch berechneten und der tatsächlich gemessenen Stromantwort.

Bei einer komplizierten Abhängigkeit der Kapazität von der Spannung oder bei einem komplizierten Spannungspuls ist es im Allgemeinen nicht möglich, die theoretisch erwartete Stromantwort zu berechnen. Lösungsmethoden, die mit Ableitungen arbeiten, stehen für das beschriebene Problem daher nicht zur Verfügung. In Frage kommen anstatt dessen heuristische Direktsuchverfahren, die auf Gradienten verzichten. Ein relativ simples und intuitives Verfahren entwickelten Hooke und Jeeves im Jahr 1961 [68]. Das Verfahren ließ sich leicht in Igor implementieren, ist sehr robust und effizient.

Von einem Startpunkt im Parameterraum aus werden abwechselnd sogenannte Tast- und Voranschreitschritte (exploratory und pattern moves) ausgeführt. Ein Tastschritt besteht aus dem Abtasten der Umgebung des jeweiligen Punktes auf der Suche nach

einer Verkleinerung der Zielfunktion. Dazu werden sukzessive zu jedem Parameter individuelle Tastweiten addiert und subtrahiert und die Zielfunktion ausgewertet. Bei einer Verbesserung wird in die gefundene Richtung vorangeschritten und ein neuer Punkt im Parameterraum festgelegt. Von hier aus erfolgt ein neuer Tastschritt. Wird keine Verbesserung in der Umgebung gefunden werden die individuellen Tastweiten halbiert. Das beschriebene Prozedere wird iterativ fortgesetzt bis ein Abbruchkriterium erfüllt ist. In Frage kommt zum Beispiel eine minimale Tastweite oder eine maximale Anzahl an Iterationen. Das Verfahren lässt sich anschaulich in einem Flussdiagramm darstellen (siehe Abbildung 11).

Nebenbedingungen lassen sich in diesem Verfahren einfach berücksichtigen, in dem man bei Verletzung der jeweiligen Bedingung künstlich die Zielfunktion erhöht.

Die Implementierung dieses Verfahrens in Igor wurde auf der Basis eines optimierten Programmcodes von A.F. Kaupe [69] vorgenommen.

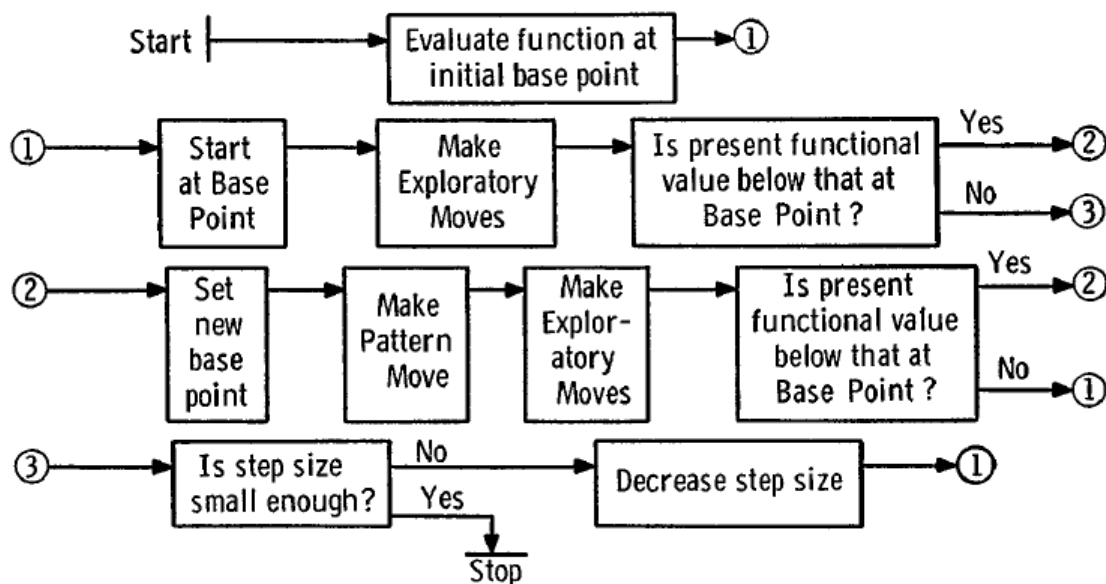


Abbildung 11 – Flussdiagramm des Hooke Jeeves Algorithmus. Grafik aus [68].

Messung der nichtlinearen Kapazität

Ist die Kapazität der Membran aus Abbildung 5 spannungsabhängig, müssen zur Messung der Zellparameter die beschriebenen Methoden angepasst werden.

Eine etablierte Methode ist die Benutzung der Lock-inTechnik. Die Sinuspulse mit den beiden Frequenzen werden dazu mit einer Treppenfunktion überlagert, die den zu untersuchenden Bereich abtastet. Nun können an diskreten Spannungspunkten die Werte gemessen werden.

Eine weitere Möglichkeit ist die Benutzung einer Spannungsrampe. Falls die Form der Spannungsabhängigkeit der Kapazität bekannt ist und eine entsprechende Formel zur Verfügung steht, können die gesuchten Parameter in Form einer Optimierung bestimmt werden. Die Stromantwort für bestimmte Zellparameter und zusätzlich Parameter der nichtlinearen Kapazität wird mit Hilfe des Simulationskerns berechnet und von der

gemessenen Stromantwort abgezogen. Mit Hilfe des Hooke-Jeeves-Verfahrens werden diese Parameter nun optimiert. Um ein möglichst gutes Ergebnis zu erzielen, muss die Spannungsrampe wie bei der oben beschriebenen Spannungstreppe den zu untersuchenden Bereich überspannen.

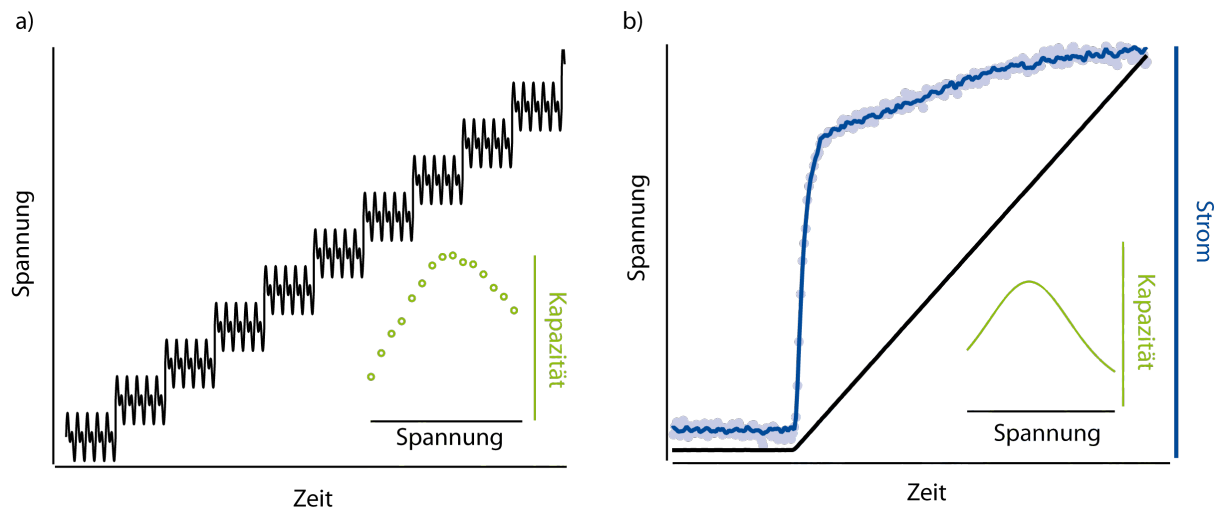


Abbildung 12 – Methoden zur Bestimmung einer nichtlinearen Kapazität. Die Lock-in-Technik nutzt eine Spannungstreppe überlagert mit den Sinuspulsen (a) um aus der entsprechenden Stromantwort mit Hilfe der Lock-in-Analyse zu jeder Stufenspannung einen Kapazitätswert zu erhalten. Die Rampenmethode (b) nutzt die Kenntnis der erwarteten Kapazitätsabhängigkeit um die Stromantwort auf eine Spannungsrampe zu simulieren (Messwerte hellblau, Simulation dunkelblau). Ein Optimierungsverfahren liefert dann die genauen Parameter der Kapazität.

3.2.3 Messung der Zellreaktion

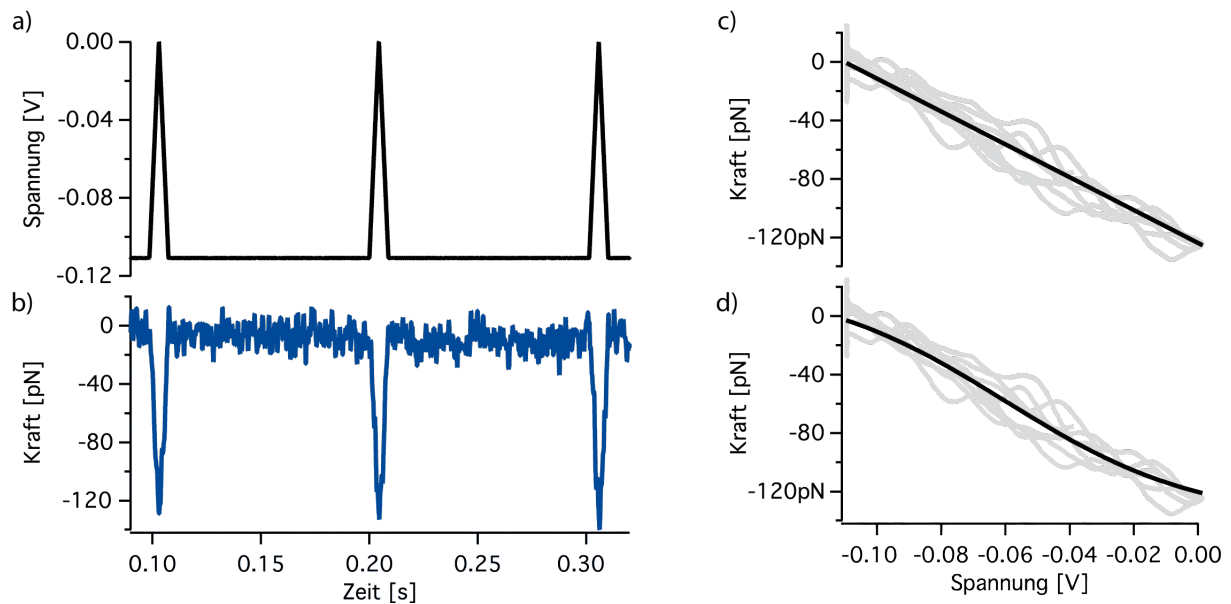


Abbildung 13 – Bestimmung der durchschnittlichen Reaktion. Ein an die Zelle angelegter, aus Rampen bestehender Spannungspuls (a) führt zu einer Reaktion der in die Zellmembran drückenden Cantileverspitze (b). Die gegen die Spannung aufgetragenen Kraftwerte werden linear gefittet (c) um die Steigung als durchschnittliche Reaktion zu erhalten. Im Fall von Prestin sollte der Kraft-Spannungsplot eine sigmoidale Form haben (d).

Die zur Messung der Zellparameter genutzten Spannungsrampen wurden ebenfalls verwendet, um simultan die mechanische Spannungsänderung der Membran zu bestimmen. Dazu wurde die Kraftentwicklung auf eine in die Membran drückende Cantileverspitze vermessen, die über die oben beschriebenen Zusammenhänge mit der Änderung der mechanischen Spannung gekoppelt ist. Die Kraftentwicklung im Bereich der Rampen wurde gegen die Spannung aufgetragen und ein linearer Fit an die Daten durchgeführt (vgl. Abbildung 13). Da man im Fall von Prestinzellen eigentlich von einer sigmoidalen Kraftentwicklung ausgehen muss, ist dies eine vereinfachte Annahme. Als Ergebnis erhält man die mittlere Reaktion in Newton pro Volt [N/V].

Im Folgenden werden Kräfte, die zu Verbiegungen des Cantilevers von der Zelle weg führen als negativ und umgekehrt Kräfte, die zu Auslenkungen in Richtung der Zelle führen als positiv definiert. Im Falle der in Abbildung 13 dargestellten eindrückenden Cantileverspitze gehen die Prestinmoleküle bei einer Depolarisation der Membran zunehmend in den kompakteren Zustand über und drücken somit die Cantileverspitze aus der Zelle hinaus. Der Cantilever erfährt somit eine laut Definition negative Kraft. Des Weiteren wird die Reaktion eines in die Zelle drückenden Spitze als positiv definiert.

3.3 Setup I: Reaktionsbestimmung nach Eindrückung

Die durchgeführten Zellexperimente bestehen aus drei Phasen. Die Cantileverspitze wird zuerst in der Kontaktierungsphase mit einer vordefinierten Kraft in die Zelle eingedrückt. Dann folgen variable Spannungspulse, die zur Messung verschiedener Charakteristika der induzierten Membranbewegung verwendet werden. Routinemäßig erfolgt immer auch die Vermessung der Zellparameter und die Amplitude der spannungsinduzierten Membranbewegung mit Hilfe einer Spannungsrampe mit verkleinerter Spannungsbreite (ca. 110 mV). Mit Hilfe anderer Spannungspulse kann beispielsweise die Frequenzabhängigkeit untersucht werden. Die drei Phasen und die gemessenen Größen sind noch einmal in Tabelle 1 zusammengefasst und in Abbildung 14 grafisch dargestellt.

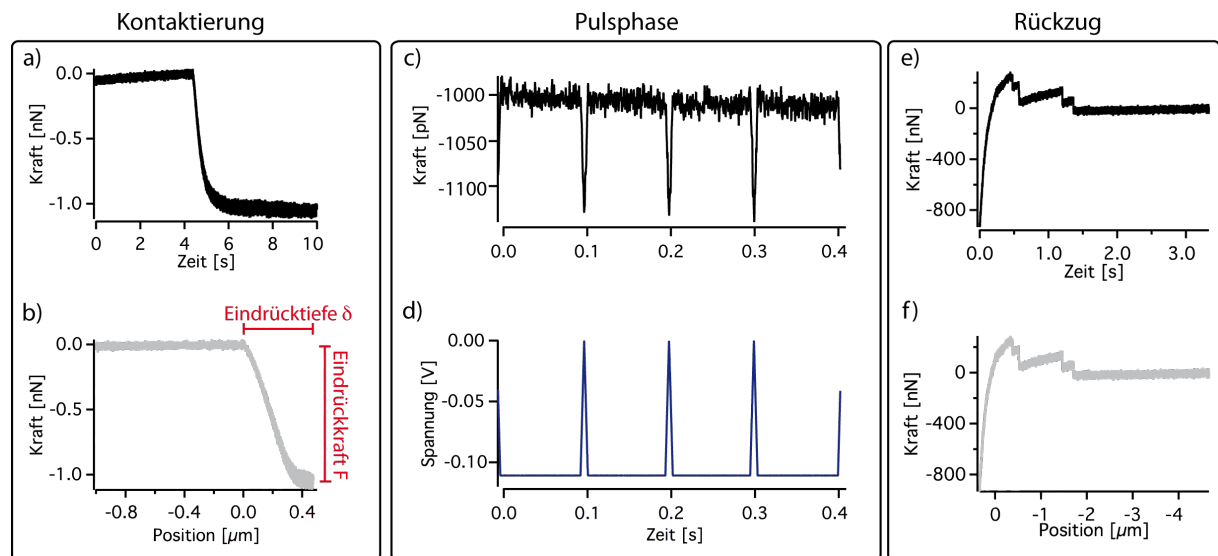


Abbildung 14 – Setup I: Dargestellt sind die drei Phasen des Experiments zur Bestimmung der spannungsinduzierten Membranbewegung an HEK-WT und HEK-Prestinzellen. Während der Kontaktierungsphase (a,b) wird die Cantileverspitze in die Zelle eingedrückt und die Größen Eindrücktiefe und Eindrückkraft bestimmt (b). Die variablen Spannungspulse während der Pulsphase (d) dienen mit Hilfe der induzierten Cantileverbewegung (c) der Vermessung der elektrischen Zellparameter und der Reaktion. Die während der Rückzugsphase (e,f) aufgenommenen Kraftkurven können zur Bestimmung von adhäsiven Kräften genutzt werden.

Phase	Kontaktieren	Pulsphase	Rückzug
Messwerte	Eindrückkraft Eindrücktiefe	Zellparameter Reaktion Verschiedenes	Adhäsionskräfte

Tabelle 1 – Messphasen des Setup I und die jeweiligen Messgrößen.

3.4 Setup II: Kontinuierliche Reaktionsbestimmung

Bei einer Erweiterung des Setups I wird während der Kontaktier- und Rückzugsphase ein Spannungspuls in Form kontinuierlicher auf- und absteigender Testrampen angelegt und die Stromspur aufgezeichnet. Eine Skizze des Ablaufs befindet sich in Abbildung 15. Dieses Design des Experiments ermöglicht es, zusätzlich zur Bestimmung der Reaktion bei einer bestimmten Eindrückkraft, die kontinuierliche Entwicklung der Reaktionswerte während der Eindrückphase bis zur eingestellten Kraft zu verfolgen. Ebenso wird die Entwicklung während der Rückzugsphase des Cantilevers aufgenommen. Somit ist es zum Beispiel auch möglich, die Membranbewegung aus der Zelle gezogener Tether zu untersuchen.

Eine Auswerteroutine detektiert automatisch die einzelnen Rampenabschnitte und führt, wie oben beschrieben, die Bestimmung der durchschnittlichen Reaktion durch. Zusammen mit den Mittelwerten der entsprechenden Datenpunkte der Positions- und der Kraftspur ergibt sich ein neuer Datensatz. Zwischen Kontaktier- und Rückzugsphase können beliebige Spannungspulse für weitergehende Untersuchungen angelegt werden. Aufgrund der hohen Anzahl an gemessenen Reaktionsdatenpunkten kann der Fehler des Mittelwertes der Messungen verringert werden und auch kleinere Korrelationen zwischen Spannungs- und Kraftsignal aufgedeckt werden.

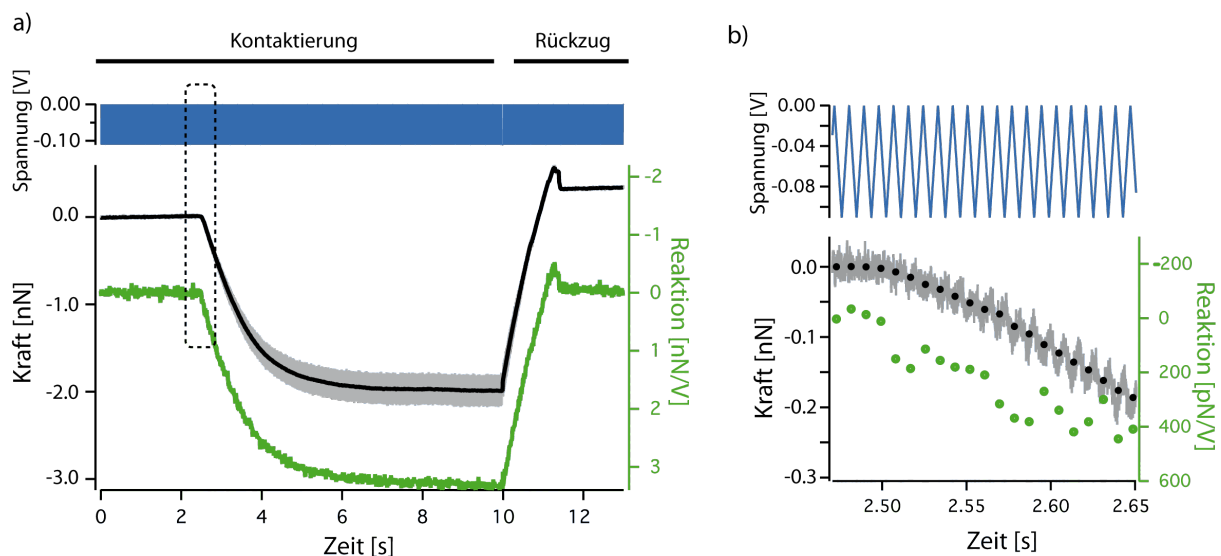


Abbildung 15 – Setup II. Während der Kontaktier- und der Rückzugsphase wird ein Spannungspuls, der aus Auf- und Abwärtsrampen besteht, an die Zelle angelegt (a). In der Grafik (a) erscheint er aufgrund der dichten Abfolge der Rampen (8,8 ms) als durchgehender Balken. Die Analyse jeder einzelnen Rampe ermöglicht es, einen Reaktionsplot mit einer Samplingrate von 8,8 ms zu erstellen. Dies kann in der Vergrößerung des in (a) markierten Abschnitts nachvollzogen werden (b). Die mit der Eindrückung zunehmende Reaktion des Cantilevers ist in (a) anhand der Verbreiterung und in (b) anhand der Ausprägung des Zackenmusters der Kraftspur zu erkennen.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Bestimmung der elektrischen Zellparameter

4.1.1 Testmessungen an einer Modelzelle

Die Genauigkeit der Lock-in- und der Spannungsrampen-Methode wurde mit Hilfe der Modelzelle MC-10 der Firma HEKA (Zubehör des EPC-10 Verstärkers) quantifiziert. Sie besteht aus den drei Hauptkomponenten des Ersatzschaltbildes aus Abbildung 5: Eingangswiderstand R_A , Membranwiderstand R_M und Membrankondensator C_M . Ein parallel geschalteter Kondensator simuliert die Kapazität der Pipette bzw. des Glaschips. Sein Beitrag in der Stromantwort wird mit Hilfe der verstärkerinternen Kompensationsschaltung eliminiert. Die Werte der Komponenten sind laut Hersteller und Markierung: $R_A = (5,10 \pm 0,05) \text{ M}\Omega$, $R_M = (500 \pm 10) \text{ M}\Omega$ und $C_M = (21 \pm 1) \text{ pF}$. Neben der in Igor implementierten Lock-in- und Spannungsrampenmethode (Seal- und NLC-Rampe) wird außerdem noch das interne Lock-in-Verfahren der Patch-Clamp-Software Patchmaster getestet. Die letztere Methode dient als gute Referenz für die Zellparameter, sie ist aber aufgrund der schwierigen Synchronisation mit den Daten der AFM-Messungen nicht für die kombinierten PC-AFM Experimente geeignet. Die Ergebnisse der Messungen sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

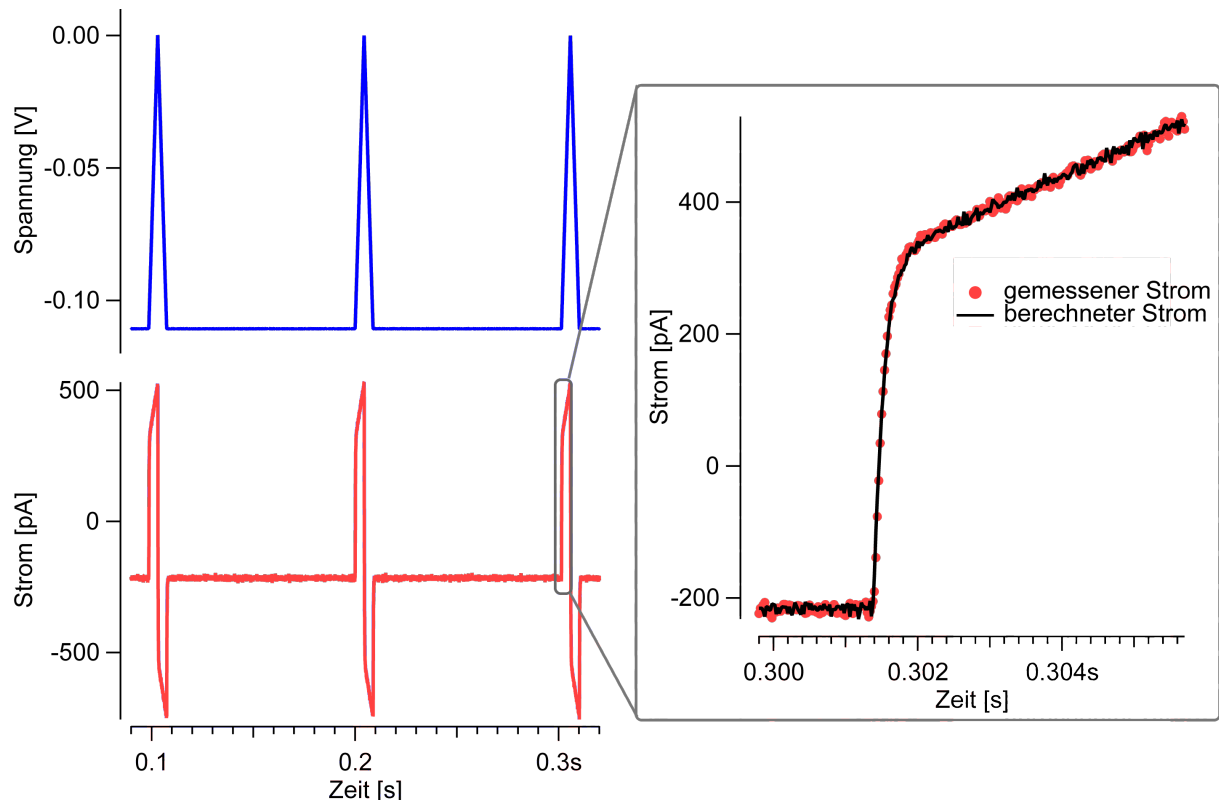


Abbildung 16 – Die Methode der Spannungsrampe: Stromantwort (rot) auf einen Spannungspuls (Seal-Puls, blau) mit integrierten Rampen, angelegt an der Modelzelle MC-10. Die drei passiven Zellparameter (vgl. Abbildung 5) werden ermittelt, in dem mit ihnen im Bereich der Aufwärtsrampe die Stromantwort simuliert (schwarz) und die Differenz zum gemessenen Strom durch Änderung der Zellparameter minimiert wird.

Die gemessenen Werte für den Membranwiderstand und die Kapazität stimmen sehr genau mit den Herstellerangaben überein. Bei der Messung von R_M erwies sich die Igor Lock-in-Methode als relativ anfällig gegenüber der Justierung der Phasendifferenz, was sich in der erhöhten Standardabweichung dieser Methode widerspiegelt. Alle Methoden liefern für den Eingangswiderstand Werte, die untereinander im Rahmen ihrer Fehler übereinstimmen, allerdings nicht den Herstellerangaben entsprechen. Die Abweichung von ca. 10% ist aber bei den durchgeführten Zellmessungen vertretbar, da der Eingangswiderstand lediglich als Indikator für eine intakte Ganzzellableitung dient, die parallel auch durch die Beobachtung des Kapazitätsverlaufs überwacht werden kann. Die Methoden eignen sich also alle zur Bestimmung der passiven Zellparameter R_A , R_M und C_M einer gepatchten Zelle.

passive Zellparameter	R_A [M Ω]	R_M [M Ω]	C_M [pF]
Beschriftung	5,10 \pm 0,01	500 \pm 10	21 \pm 1
HEKA Lock-in	5,8 \pm 0,1	504 \pm 30	21,0 \pm 0,1
Igor Lock-in	5,5 \pm 0,2	502 \pm 20	21,3 \pm 0,3
Seal Puls (117 mV)	6,0 \pm 0,7	509 \pm 6	21,3 \pm 0,1
NLC Puls (223 mV)	5,9 \pm 0,6	511 \pm 2	21,5 \pm 0,1

Tabelle 2 – Vergleich der verschiedenen Messmethoden zur Bestimmung der passiven Zellparameter der Modellzelle MC-10 (HEKA, Lambrecht/Pfalz). Angegeben sind die Herstellerangaben (Beschriftung) sowie die ermittelten Mittelwerte mit der mittleren Standardabweichung.

4.1.2 Messung der nichtlinearen Kapazität von Prestinzellen

Eine Erprobung der beschriebenen Methoden zur Vermessung der nichtlinearen Kapazität wurde mit Hilfe von HEK Zellen, die das Protein Prestin exprimieren, durchgeführt. Als Vergleich dienten HEK-WT-Zellen (wild type). In Abbildung 17 ist der typische Kapazitäts-Spannungs Verlauf einer HEK-Prestin- und einer normalen HEK Zelle, gemessen mit der Igor-Lock-in-Technik, abgebildet. Die Prestinzelle zeigt eine glockenförmige nichtlineare Kapazität, die mit der Gleichung (3) beschrieben werden kann.

$$C(V) = C_0 + Q_{\max} \frac{e^{-\frac{V-V_h}{\alpha}}}{\alpha \left(1 + e^{-\frac{V-V_h}{\alpha}} \right)} \quad (3)$$

Die Methoden müssen nun darauf getestet werden, wie genau sie die gesuchten Parameter C_0 , Q_{\max} , V_h und α bestimmen können. Als Standard gilt in diesem Fall die Lock-in-Methode des kommerziellen HEKA Systems.

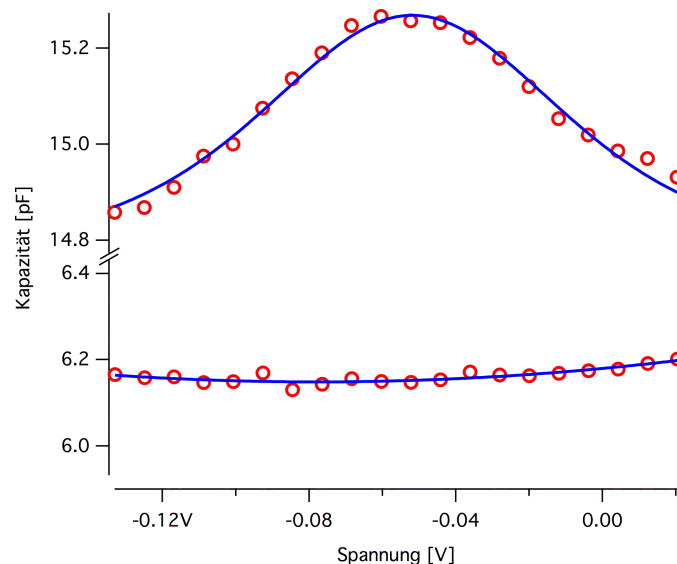


Abbildung 17 – Typischer Kapazitäts-Spannungs-Verlauf einer HEK-Prestin- und einer HEK-WT-Zelle. Die mit Hilfe der Igor-Lock-in-Technik gemessenen Kapazitätswerte einer Prestin-Zelle (oben) zeigen den typischen glockenförmigen Verlauf (Gleichung (3), $C_0=14.8\text{pF}$; $Q_{\max}=52\text{fC}$; $V_h=-0.052\text{mV}$; $\alpha=0.027$). Die Werte der HEK-WT-Zelle (unten) weisen keine signifikante Spannungsabhängigkeit auf.

NLC-Bestimmung mit der Lock-in-Methode

Zuerst wurden Messungen mit der Igor und HEKA Lock-in-Methode an fünf Prestinzellen durchgeführt. Die ermittelten Parameter sind in Abbildung 18 zusammengefasst.

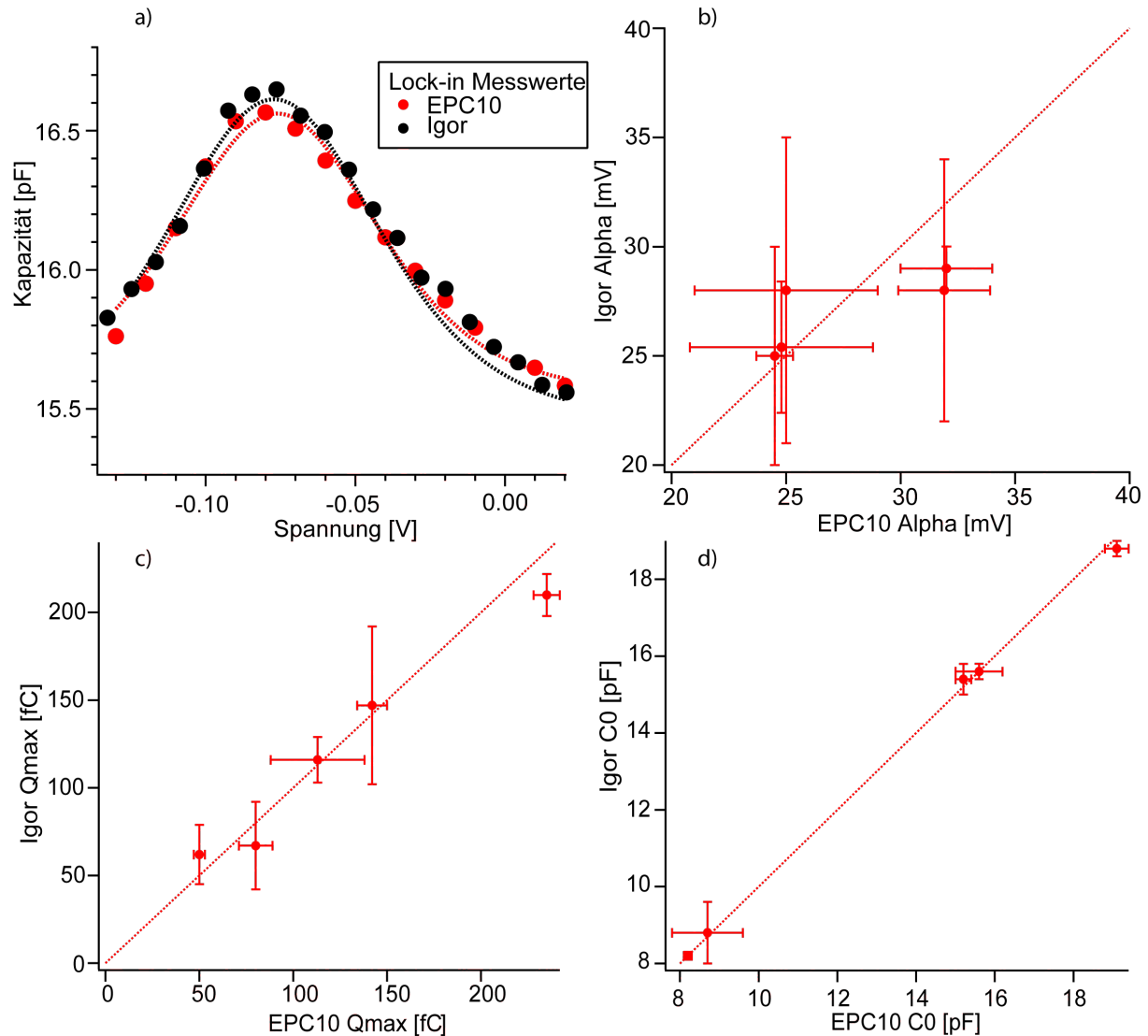


Abbildung 18 – Vergleich der Lock-in-Methoden des HEKA-Systems und der Igor Variante des Steuerexperiments bei der Messung der NLC von fünf HEK-Prestinzellen. Beide Methoden zeigen eine gute Übereinstimmung der gemessenen Kapazitätsverläufe (a) die sich im Vergleich der Fitparameter α (b), Q_{max} (c) und C_0 (d) manifestiert. Die gestrichelten Geraden zeigen die Linien der Übereinstimmung der beiden Methoden.

Es zeigt sich eine gute Übereinstimmung in den gemessenen Verläufen und den entsprechenden gefitteten Parametern aus Gleichung (3) an die Daten. Die durchschnittlichen relativen Abweichungen betragen 10% für α , 8% für Q_{max} und 1% für C_0 . Da die Werte für V_h zeitlich stärker variieren und die Messungen nicht synchron durchgeführt wurden, werden sie hier nicht näher untersucht. Die Daten aus Abbildung 18 zeigen, dass die in Igor implementierte Lock-in-Methode zur Vermessung der nichtlinearen Kapazität von HEK-Prestinzellen geeignet ist und wird im Folgenden als Referenzmethode für die Spannungsrampenmethode benutzt.

NLC-Bestimmung mit der Spannungsrampenmethode

Ebenso wie bei der Vergleichsmessung der beiden Lock-in-Methoden wurde die Spannungsrampenmethode anhand von Messungen an Prestinzellen getestet. Als Vergleichsmethode dient in diesem Fall die Igor-Lock-in-Technik die im Folgenden nur noch als Lock-in-Methode bezeichnet wird.

Abbildung 19 zeigt eine typische Stromantwort einer Prestinzelle auf den Rampenpuls (NLC-Puls). Man erkennt deutlich die „Beule“ im oberen Teil der Stromkurve, die sich im Bereich zwischen -100 mV und 0 mV des Spannungspulses bildet und bei HEK-WT-Zellen nicht zu sehen ist (vgl. Abbildung 16). Eine Simulation der Stromantwort mit konstanten passiven Zellparametern liefert hier keine befriedigenden Ergebnisse mehr (vgl. Inset in Abbildung 19). Nimmt man nun eine nichtlineare Kapazität in Form der Gleichung (3) an und führt die Optimierung der nun sechs Parameter (vgl. Tabelle 3) durch, zeigt sich eine gute Übereinstimmung der simulierten mit den gemessenen Werten.

Der Vergleich von simultan gemessenen Lock-in-Werten mit von der Rampenmethode optimierten Werten zeigt deutlich die Probleme der Technik. Speziell die kleineren Spannungsrampen (Seal-Pulse), die für die kontinuierliche Ermittlung der passiven Zellparameter zuständig sind, zeigen Schwächen, die in Abbildung 20 dargestellt sind.

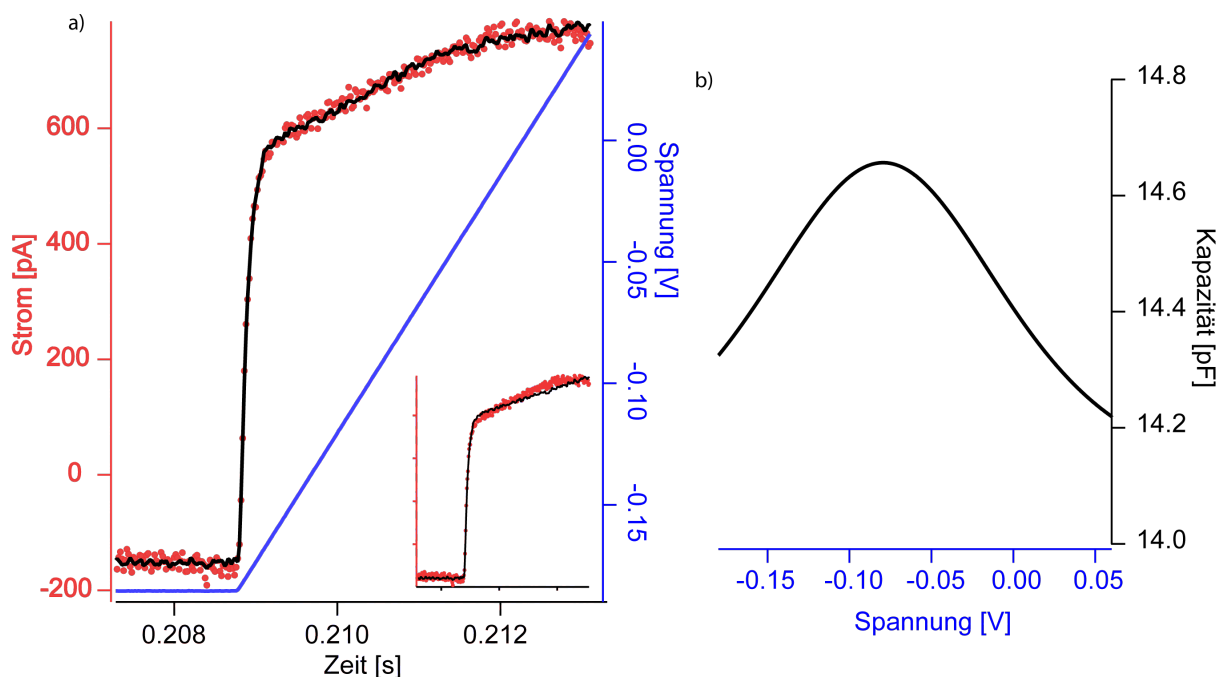


Abbildung 19 – NLC-Bestimmung mit der Spannungsrampe. Die für Prestinzellen typische „ausgebeulte“ Stromkurve (a) als Antwort auf einen Rampenpuls kann unter Annahme einer spannungsabhängigen Kapazität der durch Gleichung (3) beschriebenen Form (b) besser simuliert werden, als mit einem konstanten Wert (Inset in (a)). Mit Hilfe des Direktsuchverfahrens wird die Differenz zwischen simuliertem und gemessenem Strom minimiert. Als Ergebnis erhält man die entsprechenden Zellparameter: $R_A = 7,2 \text{ M}\Omega$; $R_M = 1,2 \text{ G}\Omega$; $C_0: 14,0 \text{ pF}$; $\alpha = 48,0 \text{ mV}$; $Q_{max} = 104 \text{ fC}$; $V_h = -80,0 \text{ mV}$.

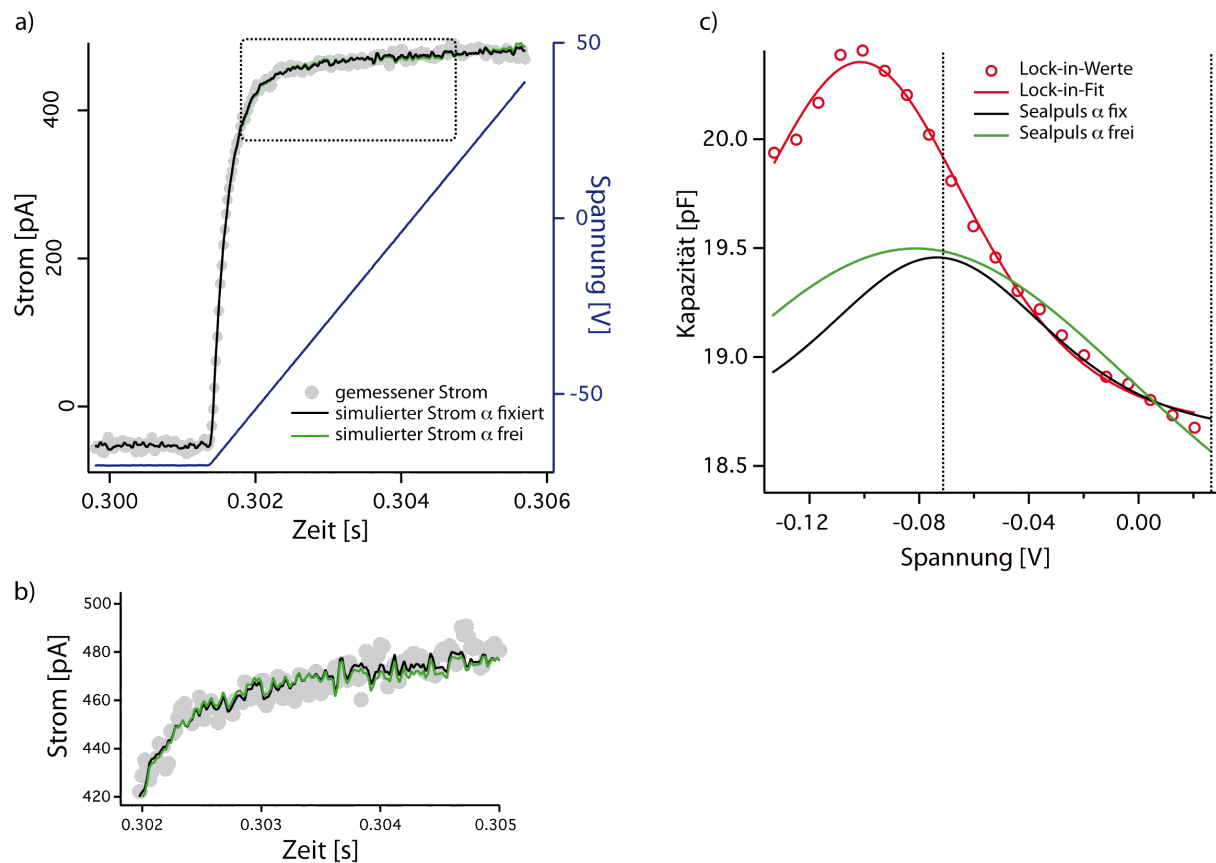


Abbildung 20 – Probleme der Rampenmethode. Die Rampenmethode erweist sich als relativ unsensitiv gegenüber Änderungen der Parameter α und Q_{max} der nichtlinearen Kapazität. Obwohl α und Q_{max} sich bei den beiden in (a) und vergrößert in (b) gezeigten simulierten Stromkurven um den Faktor 2 bzw. 4 unterscheiden, sind die Auswirkungen marginal. Die Schwankung der gemessenen Stromwerte ist größer als die Differenzen der beiden Stromkurven. Der Grund liegt unter anderem in der Beschränkung des durch die Rampe abgetasteten Bereichs. Die Plots der nichtlinearen Kapazitäten und im Vergleich die tatsächlich gemessene Kapazitätswerte (c) weisen im markierten Spannungsbereich des Rampenpulses keine großen Differenzen auf. Der Charakter der Form der nichtlinearen Kapazität stimmt bei fixiertem α besser mit den insgesamt gemessenen Werten bzw. einem entsprechenden Fit überein. Alle Werte der drei gezeigten Kapazitäten sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

	R_A [M Ω]	R_M [G Ω]	C_0 [pF]	Q_{max} [fC]	V_h [mV]	α [mV]	Stromfehler [pA]
Lock-in	10,3	1,22	18,7	187	-102	27	-
Seal α fixiert	10,5	1,32	18,5	100	-66	27	6,2
Seal α frei	10,7	1,31	17,7	422	-81	59	5,5

Tabelle 3 – Optimierte und gefittete Parameter der in Abbildung 20 gezeigten nichtlinearen Kapazitäten. Bei dem Stromfehler handelt es sich um die mittlere Differenz der simulierten und gemessenen Werte.

Wird durch die geringere Abtastweite des schmalen Seal-Pulses die Charakteristik der nichtlinearen Kapazität nicht mehr komplett erfasst, weisen die optimierten Parameter eine erhebliche Abweichung von den Lock-in-Werten auf. Die entsprechenden Werte für die in Abbildung 20 gezeigten Kurven sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Man kann zwar eine relativ gute Übereinstimmung im abgetasteten Bereich von -70 mV bis 25 mV

erkennen, allerdings gibt es eine Vielzahl an Parameterkonstellationen, die dies ermöglichen. Hält man einen Parameter wie zum Beispiel α fest (ein Festhalten des α -Wertes ist am sinnvollsten, da er von Zelle zu Zelle am wenigsten schwanken sollte), zeigen die damit ermittelte NLC-Werte immer noch eine erhebliche Abweichung von den Messwerten. Allerdings ist die Charakteristik der Kurve damit wieder mehr oder weniger hergestellt. Wie man ebenfalls in Abbildung 20 erkennen kann, führen selbst große Differenzen der Parameter zu kaum sichtbaren Unterschieden in der berechneten Stromantwort. Es handelt sich hier um ein intrinsisches Problem der Spannungsrampenmethode: Große Veränderungen im Parameterraum der gesuchten Größen führen nur zu geringen Abweichungen in der Vergleichsgröße Stromantwort, die in der Größenordnung des Rauschens liegen.

Die Spannungsrampenmethode ist also nicht in der Lage, die genauen Parameter der nichtlinearen Kapazität einzeln aufzulösen.

Abschätzung des Prestingehalts

Aus Abbildung 19 kann man weiterhin die Hoffnung schöpfen, den zusätzlichen nichtlinearen Anteil der gesamten Kapazität bestimmen zu können. Aus Gleichung (3) ergibt sich für die Differenz zwischen maximaler und minimaler Kapazität ein Wert der proportional zu Q_{max}/α ist. Die Idee ist nun, bei einem fixierten α eine gute Abschätzung für den Wert Q_{max} und somit für den Prestingehalt zu bekommen. Der Wert für α sollte eigentlich für die Zellen konstant bleiben, da er lediglich die charakteristische Ladungsverschiebung bei der Konformationsänderung eines Prestinmoleküls beschreibt. Die Literatur und die durchgeführten Messungen zeigen allerdings relativ variable Werte für α zwischen 25 mV und 45 mV. Aufgrund einer ersten Messreihe an HEK-Prestinzellen wurde der Wert für α für die folgenden Experimenten auf 43 mV fixiert.

Um die beschriebene Methode zu testen, wurden Messungen an 18 Prestinzellen und zusätzlich sechs HEK-WT-Zellen durchgeführt. In Abbildung 21 ist der zeitliche Verlauf ausgewählter Parameter bei einem entsprechenden Experiment dargestellt. Es stellte sich heraus, dass die Spannungsrampenmethode bei Membranwiderständen R_M unter einem Wert von ca. einem Gigaohm keine reproduzierbaren Werte mehr liefert (vgl. Abbildung 21). Für die Auswertung der Daten wurden daher nur die Werte verwendet, bei denen R_M über einem Grenzwert von einem Gigaohm lag. Um zusätzlich einen Zusammenbruch der Ganzzellableitung auszuschließen, wurden ebenfalls nur Werte verwendet, bei denen der Zugangswiderstand R_A unter einem Grenzwert von 30 M Ω und die Kapazität C_M größer als 4 pF war. Die Messwerte aus den Experimenten wurden wie oben beschrieben gefiltert, um den Mittelwert der entsprechenden Größen zu bilden und die Standardabweichung als Fehler zu verwenden. Die gemessenen Werte sind in Abbildung 22 zusammengefasst.

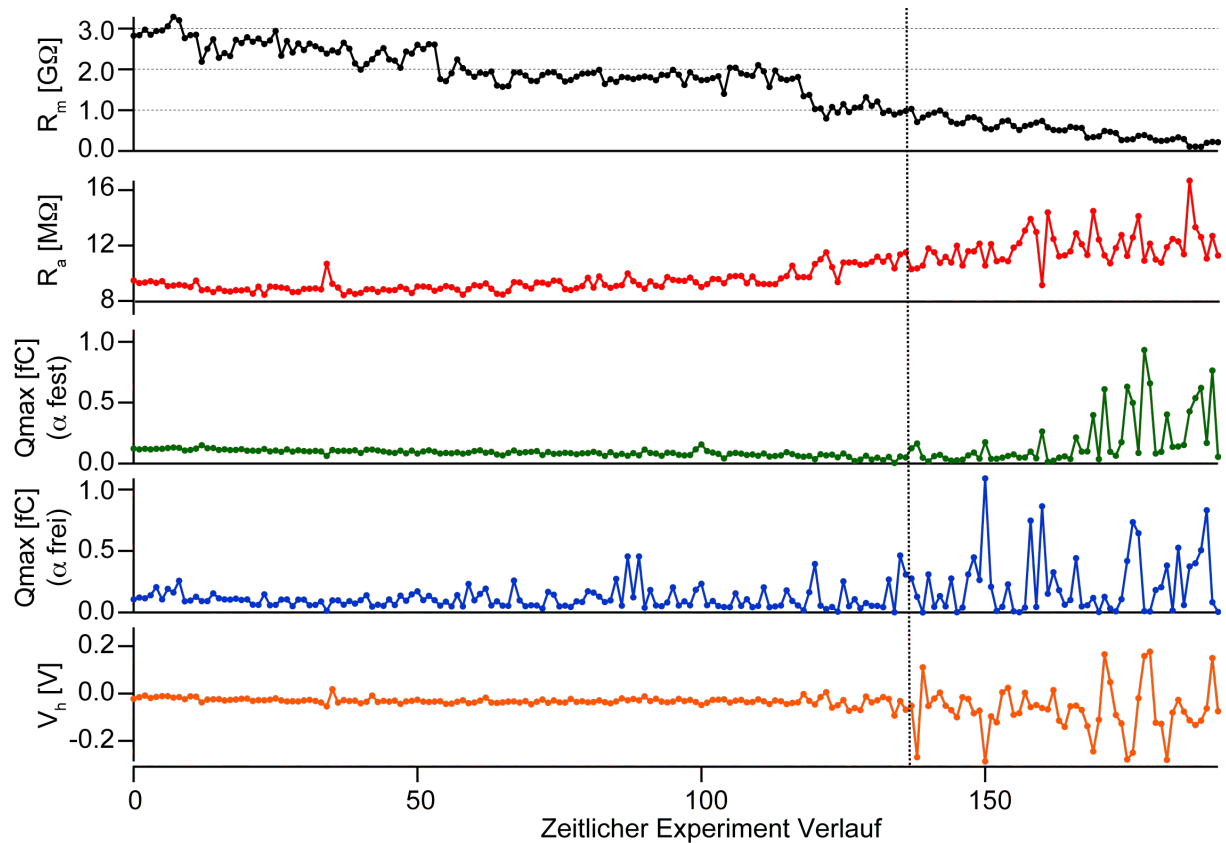


Abbildung 21 – Zeitlicher Verlauf ausgewählter Zellparameter während eines Experiments an einer Prestinzelle, aufgenommen mit der Spannungsrampenmethode. Der Membranwiderstands R_M fällt kontinuierlich im Laufe der Messung und bestimmt somit das zeitliche Messfenster. Das stetige Ansteigen von R_A zeugt von einer allmählichen „Verstopfung“ des Zellzugangs. Fällt R_M unter ca. einen Gigaohm weisen die Parameter der nichtlinearen Kapazität Q_{max} und V_h zunehmend starke Schwankungen auf, während sie zuvor relativ konstant waren. Die Fluktuation von Q_{max} ist bei fixiertem α deutlich geringer als bei variablem.

Die gemessenen Kapazitätswerte weisen eine sehr gute Übereinstimmung auf. Ein linearer Fit zeigt eine Steigung von 1,0 und einen relativ geringen Offset von 0,3 pF bei einem Korrelationskoeffizienten von ebenfalls 1,0. Somit sind die beiden Methoden bei der Bestimmung der Kapazität fast perfekt korreliert. Anders sieht es bei dem Vergleich der gemessenen Werte für Q_{max} aus. Es ist leicht ersichtlich, dass die Methode hier keine sehr verlässlichen Werte für Q_{max} liefert. Der lineare Fit zeigt zwar mit einer Steigung von 0,9 einen relativ vernünftigen Zusammenhang zwischen der Spannungsrampen und Lock-in-Methode, der Korrelationskoeffizient von 0,55 ist dabei aber nicht sehr hoch. Eine Unterscheidung zwischen HEK-WT-Zellen und HEK-Prestinzellen ist aber dennoch möglich. Aus der Perspektive der Lock-in-Daten erkennt man einen Abstand zwischen der Population der HEK-WT- und der HEK-Prestinzellen. Als Grenzwert kann man in etwa 50 fC angeben. Überträgt man diesen Grenzwert auf die Spannungsrampendaten, sieht man ebenfalls die Teilung der beiden Populationen. Hier bildet jeweils eine Zelle der 6 bzw. 18 WT- bzw. Prestinzellen eine Ausnahme. Mit Hilfe der beschriebenen Technik kann man also statistisch relativ sicher feststellen, ob eine Zelle tatsächlich das Protein Prestin exprimiert oder nicht. Diese Aussage wird auch durch eine entsprechende Statistik bestätigt, die die Daten von weiteren 25 Zellen aus Experimenten der kombinierten Messung von AFM und PC-Daten zusammenfasst (vgl. Abbildung 23). Die Teilung der Prestin- und WT-Zellen kann hier eindeutig an der 50 fC Grenze festgemacht werden.

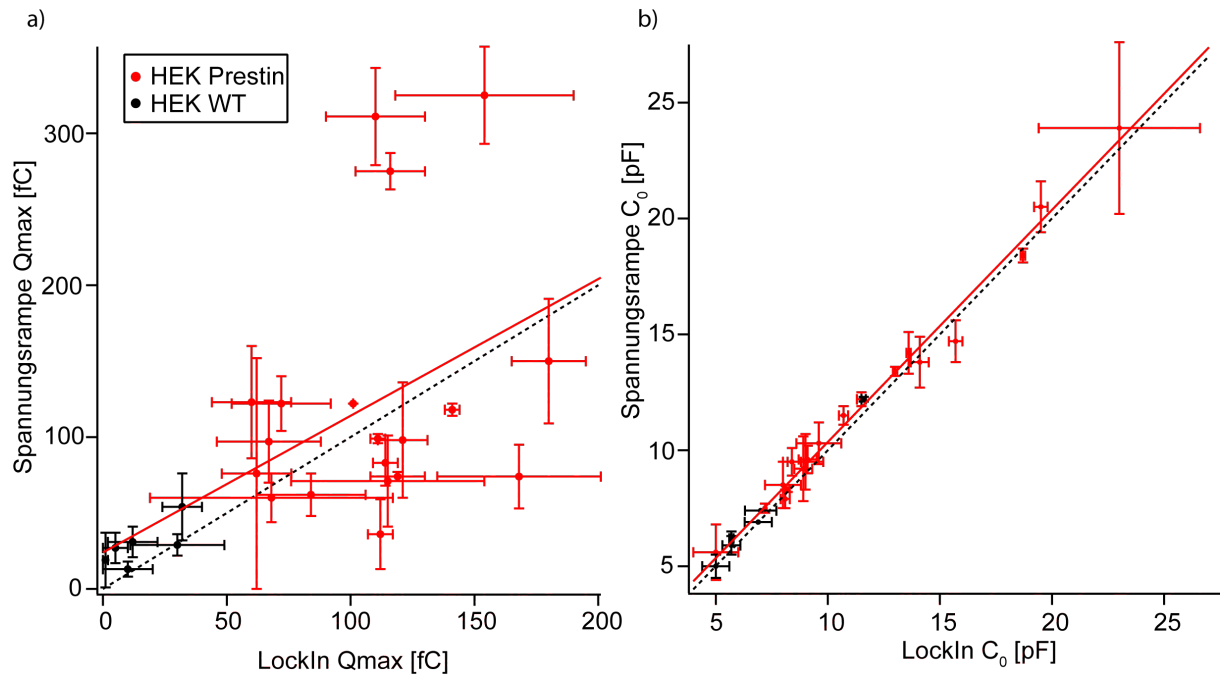


Abbildung 22 – Vergleich der Spannungsrampen- und Lock-in-Methode anhand gemessener Q_{max} - und C_0 -Werte. Trägt man die gemessenen Q_{max} -Werte der beiden Methoden gegeneinander auf, zeigt sich eine relativ große Streuung der Daten (a). Ein linearer Fit weist zwar eine Steigung von 0,9 auf, der Korrelationskoeffizient ist aber mit 0,55 relativ niedrig. Die Daten der WT- und Prestinzellen lassen sich relativ gut bei einem Wert von ca. 50 fC trennen. Der Vergleich der Kapazitätswerte zeigt eine fast perfekte Übereinstimmung (b). Die Steigung (1,0) eines linearen Fits, der kleine Offset (0,3 pF, systematischer Fehler) und ein optimaler Korrelationskoeffizient (1,0) bestätigen dies. Die schwarz gestrichelten Linien zeigen jeweils die Punkte der 100% Übereinstimmung mit der Lock-in-Methode.

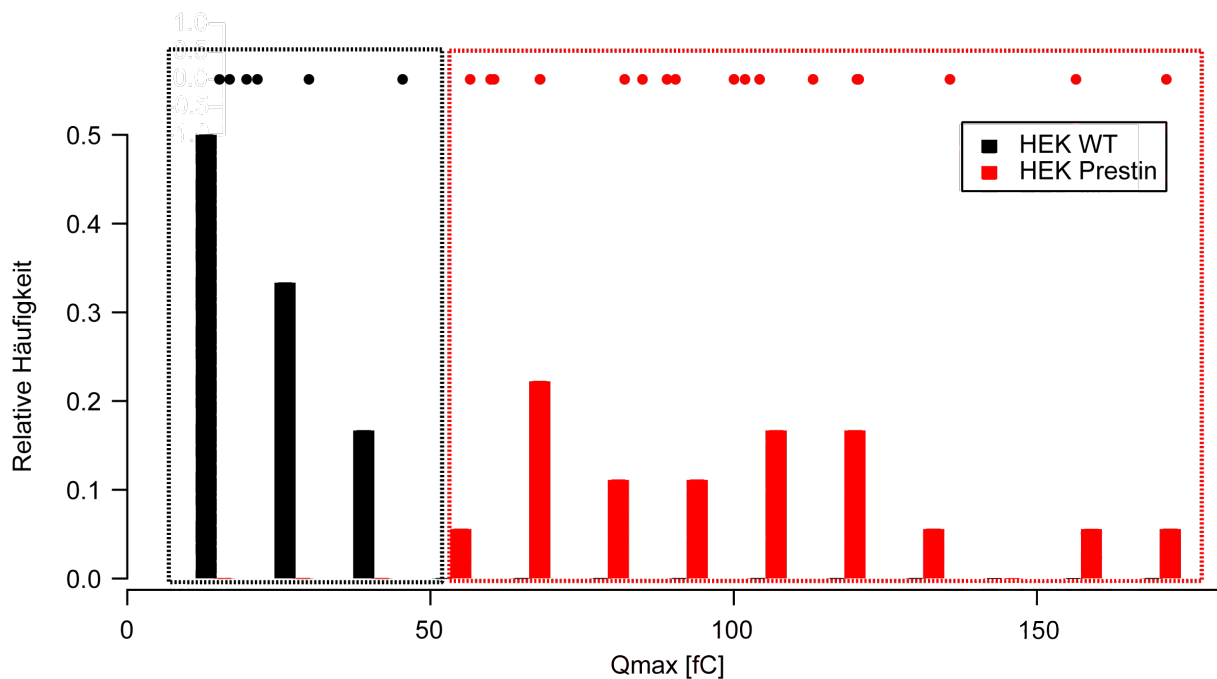


Abbildung 23 – Mit der Spannungsrampenmethode bestimmte Q_{max} -Werte von 25 Zellen. Die Verteilung der gemessenen Werte der 6 WT- und 19 Prestinzellen teilen sich in zwei Populationen unter und über einem Grenzwert von 50 fC auf.

Um der Ursache der schwachen Korrelation zwischen den gemessenen Q_{max} -Werten der beiden Methoden auf den Grund zu gehen, kann man versuchen die jeweiligen Differenzwerte mit anderen Faktoren zu korrelieren. In Betracht kommen zum Beispiel die Differenz zwischen festgelegtem α und tatsächlichen α , beschrieben durch den relativen Fehler oder die mittlere Differenz der simulierten und der gemessenen Stromwerte, im Folgenden als Stromfehler bezeichnet. Die entsprechenden Graphen sind in Abbildung 24 dargestellt.

Wie bereits Abbildung 20 und entsprechende Überlegungen vermuten ließen, besteht nahezu keine Korrelation zwischen dem Stromfehler und dem relativen Fehler der Q_{max} -Werte (Korrelationskoeffizient 0,0). Anders sieht es für die Korrelation mit dem relativen Fehler von α aus (Korrelationskoeffizient 0,6). Es scheint tatsächlich so, dass es einen linearen Zusammenhang zwischen dem Fehler durch die Festlegung von α und den auftretenden Diskrepanzen der Q_{max} -Werte gibt. Da für eine Beseitigung dieses Problems allerdings die genau Kenntnis des Wertes für α nötig wäre, ist diese Erkenntnis für eine Verbesserung der Anwendbarkeit der Rampenmethode nutzlos.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die Spannungsrampenmethode benutzt werden kann, um zwischen HEK-Prestin- und HEK-WT-Zellen zu unterscheiden. Eine genauere Analyse und Messung der Parameter der nichtlinearen Kapazität, mit Ausnahme von C_0 , ist aber nicht möglich. Insgesamt eignet sich die Spannungsrampen Methode trotz der beschriebenen Defizite, um die passiven Zellparameter R_A , R_M und C_M .

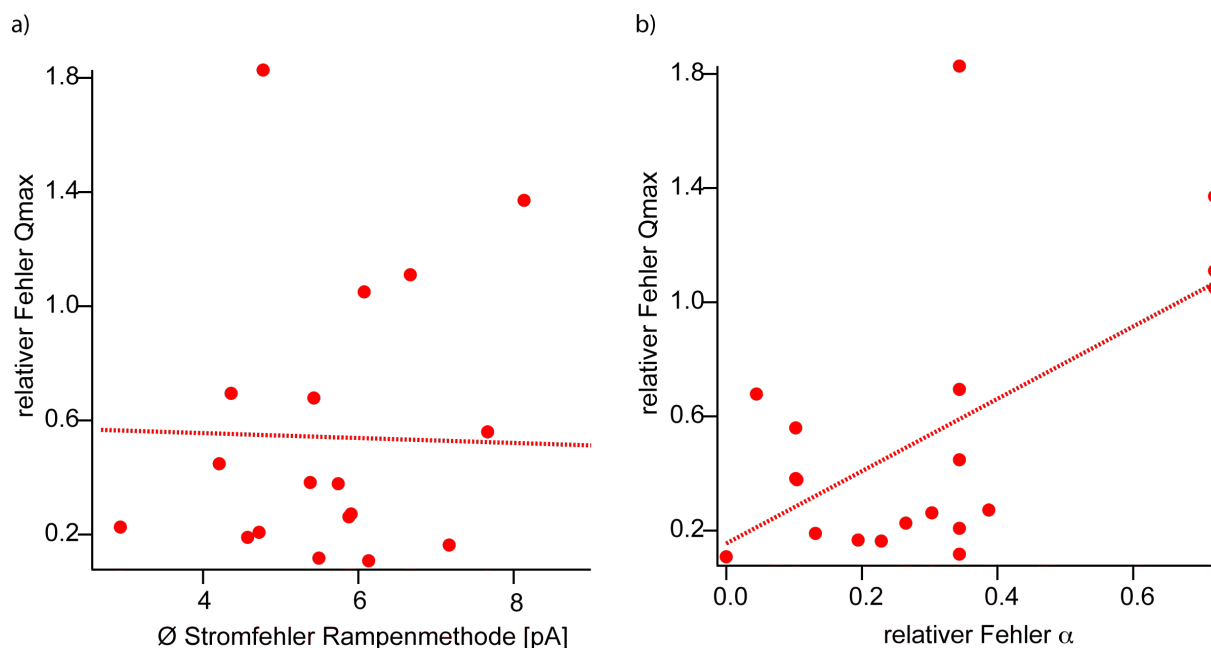


Abbildung 24 – Korrelationen zwischen dem relativen Q_{max} -Fehler der Rampen- und Lock-in-Technik und anderen Größen. Die Auftragung der relativen Fehler der Methoden gegen den mittleren Stromfehler (a) zeigt keine Korrelation was ein linearer Fit mit einem Korrelationskoeffizienten von -0,04 bestätigt. Eine schwache Korrelation weisen relativer Q_{max} -Fehler und relativer α -Fehler auf (b) (Korrelationskoeffizient 0,58).

4.2 Prestin

Die im Folgenden verwendeten Prestinzellen wurden anhand von 19 Beispielen charakterisiert. Die mit Hilfe der Lock-in-Technik gemessenen Durchschnittswerte mit der jeweiligen Standardabweichung waren für die Kapazität $(11,6 \pm 4,8)$ pF, (800 ± 330) $1/\mu\text{m}^2$ für die Prestindichte σ_P (Q_{\max} (110 ± 35) fC) und (35 ± 8) mV für α . Sechs untersuchte HEK-WT-Zellen zeigten alle keine nichtlineare Kapazität und sind mit einer Kapazität von $(7,3 \pm 2,6)$ pF etwas kleiner als die Prestinzellen. Die Prestindichte wurde dabei mit Hilfe der spezifischen Membrankapazität ($0,01 \mu\text{m}^2/\text{pF}$) und der ermittelten Q_{\max} - und α -Werte anhand der Formel

$$\sigma_P [\mu\text{m}^{-2}] = \frac{Q_{\max} \alpha}{k_B T} \frac{0.01}{C_M [\text{pF}]} \quad (54)$$

abgeschätzt. Die gepatchten Zellen wurden zwischen den Messungen auf einer Spannung von -40 mV gehalten.

4.2.1 Reaktionsmessungen nach Eindrückung

Versuche mit Cantilevern ohne Spitze

Um zu untersuchen, welche Rolle die globale Verformung der ganzen Zellen und deren spannungsabhängigen Rückstellkräfte bei den durchgeführten Indentationsversuchen spielt, wurden Experimente mit flachen Cantilevern durchgeführt. Die Zelle wurde mit einer definierten Kraft von bis zu zwei Nanonewton "platt gedrückt" und die spannungsinduzierte Reaktion vermessen. Es zeigte sich, dass die Zellen und der Abdichtwiderstand bei vergleichbaren Kräften wie bei der Eindrückung der Spitze deutlich empfindlicher reagierten. Das zur Verfügung stehende Zeitfenster war in diesen Versuchen deutlich kleiner, als in entsprechenden Versuchen mit einem spitzen Cantilever. Die Positionierung des Cantilevers über der Zelle war präzise vorzunehmen, da bei einer Eindrückung in der Nähe des Randes des Cantilevers eine Asymmetrie der Eindrückung entstehen konnte, wenn die Zelle bei der Kontaktierung über den Rand hinausragte. Alle durchgeführten Experimente zeigten keine messbare Reaktion des Cantilevers bei der Anlegung des Seal- und NLC-Pulses. Eine globale Verformung der Zelle und entsprechende Kräfte spielen also bei der Eindrückung der Spitze in die Membran maximal eine untergeordnete Rolle.

Simultane Messung von Kraft und Kapazität in Abhängigkeit der Spannung

Die simultane Messung der spannungsabhängigen mechanischen Aktivität und der nichtlinearen Kapazität von Prestin erfolgte mit Hilfe eines in die Membran eindrückenden Cantilevers. Die Analyse dessen Bewegung, hervorgerufen durch eine bestimmte Kommandospannung, liefert Informationen über die Funktionsweise von Prestin, insbesondere der Kopplung der elektrischen und mechanischen Aktivität.

Es wurden sowohl Messungen mit den Spannungsrampen (Seal- und NLC-Puls) als auch der Lock-in-Treppe (Lock-in-Puls) durchgeführt. Da, wie oben beschrieben, die

Messgenauigkeit der mit den Spannungsrampen bestimmten Zellparameter zu gering ist, eignet sich diese Methode nicht um die gesuchten Werte simultan zu ermitteln. Legt man die Rampen- und den Lock-in-Puls aber zeitlich dicht gefolgt an der Zelle an, so kann man die Variation zeitlich veränderlicher Parameter wie zum Beispiel V_h minimieren. Abbildung 25 stellt die an einer HEK-Prestinzelle gemessenen Zusammenhänge dar. Die Auftragung der Cantileverreaktion gegen die Spannung weist eine sigmoidale Form auf. Die Daten können gut durch die in Gleichung (4) beschriebene Zweizustands-Boltzmannfunktion dargestellt werden. Die Ausprägung der beschriebenen Charakteristik ist bei der Kraftantwort auf den kleineren Seal-Puls nicht so augenscheinlich. Der entsprechende Fit weicht deshalb von dem an die NLC-Antwort ab. Die V_h -Werte der beiden Boltzmannfunktionen (Seal-Puls -39 mV, NLC-Puls -27 mV) sind im Vergleich zum V_h -Wert der zuvor gemessenen Kapazität ($V_h = -44$ mV) in depolarisierte Richtung verschoben. Die aufgezeigten Zusammenhänge lassen allerdings nicht den Schluss zu, dass die nichtlineare Kapazität und die mechanische Aktivität in der dargestellten Weise voneinander abweichen. Die intrinsische Abhängigkeit des Scheitelwerts (V_h -Wert) der NLC von der Transmembranspannung bedeutet, dass die Verwendung unterschiedlicher Pulse zu Differenzen in den gemessenen Parametern führen können. Insbesondere die unterschiedlichen Startspannungen (Lock-in-Rampe -133mV, Seal-Puls -111mV und NLC-Puls -185mV) und Steigungen (Lock-in-Rampe 0,15 V/s, Seal-Puls 25 V/s und NLC-Puls 50V/s) der Depolarisation führen deswegen zu einer unterschiedlichen Verschiebung der V_h -Werte. Ein negativer Vorpuls im physiologischen Bereich bewirkt eine ein bis zweistellige Verschiebung im Millivoltbereich in depolarisierende Richtung mit einer exponentiellen Zeitkonstante von ca. 50ms [70]. Viskoelastische Eigenschaften der Zellmembran könnten auch eine Rolle spielen, da sie zu einem Zeitversatz zwischen aktiven und reaktiven Größen führen können. Eine später ermittelte viskoelastische Zeitkonstante für Membrantether (Kapitel über negative Reaktionen) liegt mit ca. 7 ms in einem für die Rampenpulse relevanten Bereich (8,8 ms). Die observierten Unterschiede der V_h -Werte können durch diese Mechanismen erklärt werden.

Die Kontrollmessungen an HEK-WT-Zellen zeigen ebenfalls die für alle ladungstragenden Membranen charakteristische spannungsabhängige Bewegung des Cantilevers (vgl. Abbildung 26 und [43]). Hier ist die Reaktion allerdings nicht sigmoidal sondern linear. Die Kraft-Spannungsabhängigkeit, wie auch der zuvor mit der Lock-in-Technik gemessene Kapazitäts-Spannungszusammenhang, kann durch eine Gerade beschrieben werden. Die Differenzen der gemessenen Abhängigkeiten an HEK-WT- und HEK-Prestinzellen zeigen die Beteiligung des Proteins Prestin, die wie beschrieben einen sigmoidalen Charakter aufweist.

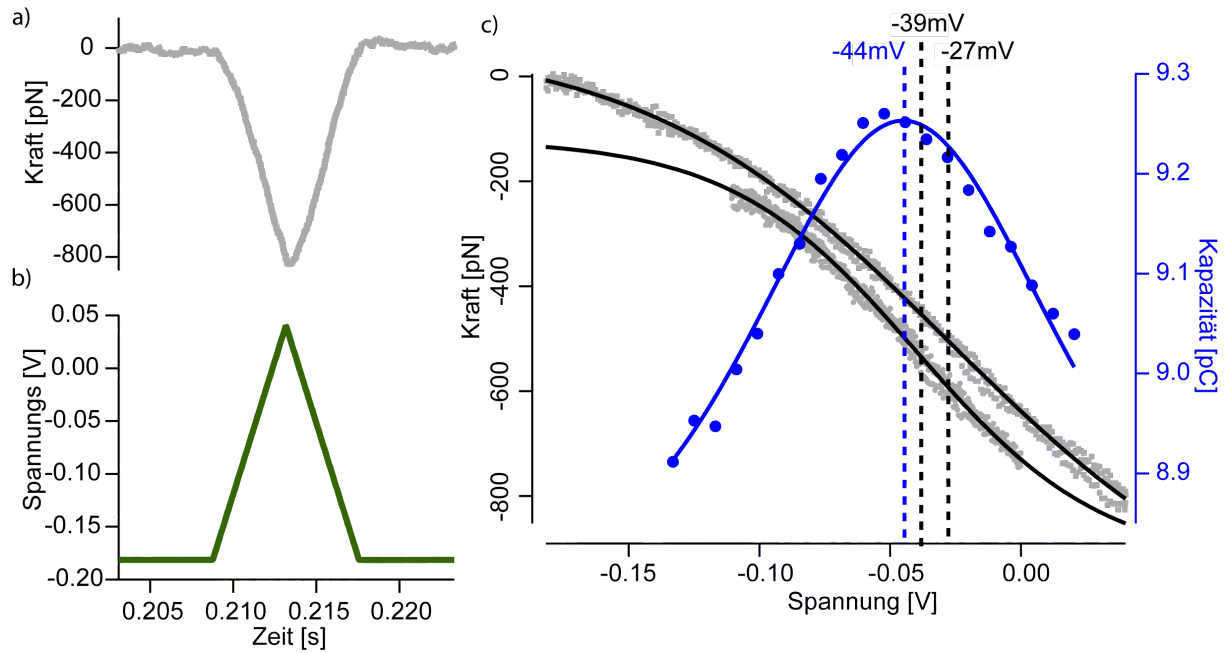


Abbildung 25 – Reaktion einer HEK-Prestinzelle auf Seal- und NLC-Puls. Die Kraftentwicklung (a) des Cantilevers auf einen NLC-Puls (b) zeigt bei der Auftragung gegen die Spannung einen sigmoidalen Zusammenhang (c) der gut mit der durch Gleichung (4) beschriebenen Boltzmannfunktion gefittet werden kann (durgezogene schwarze Linie). Die Reaktion auf den schmalere Seal-Puls ist in dem entsprechenden Spannungsbereich fast identisch (in Richtung der Kraftachse zur besseren Sicht verschoben), die Fits zeigen jedoch aufgrund des eingeschränkten Bereichs größere Differenzen. Der Scheitelwert V_h (-44 mV) der kurz zuvor gemessene Kapazität (blau) ist im Vergleich zu den V_h -Werten der Rampenfits (Seal-Puls -39 mV, NLC-Puls -27 mV) hyperpolar verschoben. Fit-Werte: Seal-Puls K_{max} 1,4 nN; α 61 mV; V_h -39 mV, NLC-Puls K_{max} 1,2 nN; α 59 mV; V_h -27 mV, Kapazität C_0 8,8 pC; Q_{max} 73 fC; α 37 mV; V_h -44 mV.

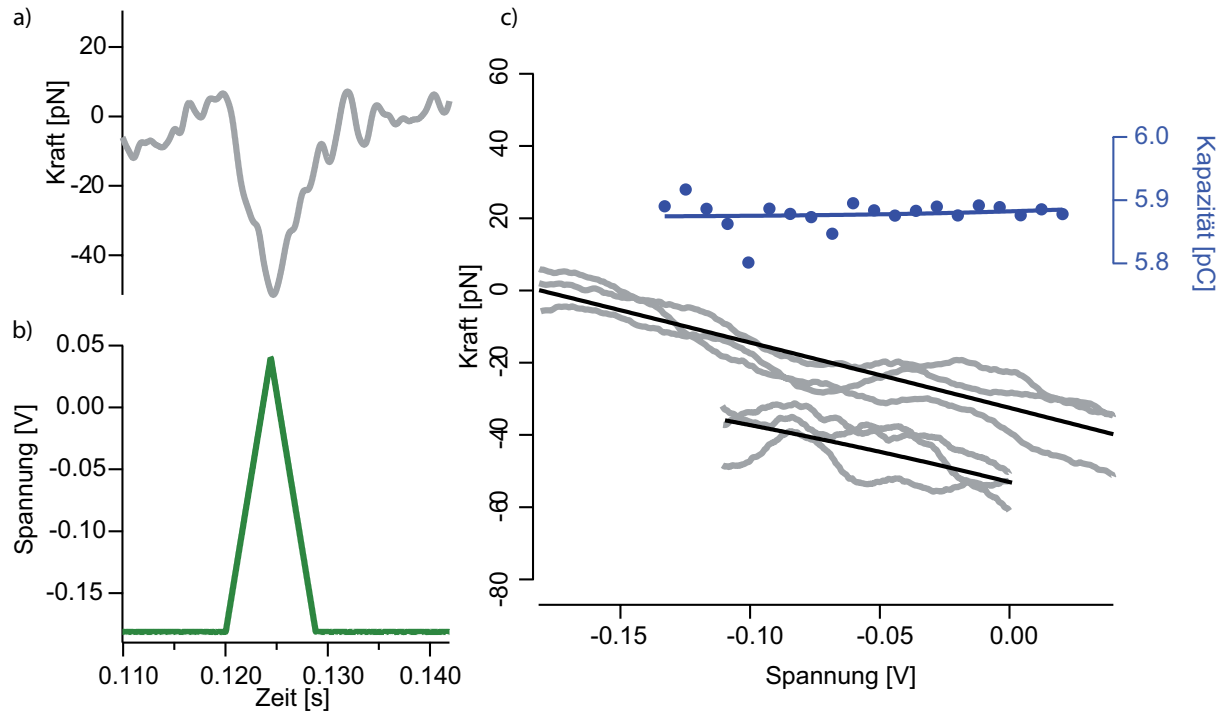


Abbildung 26 – Reaktion einer HEK-WT-Zelle auf Seal- und NLC-Puls. Die Kraftentwicklung (a) des Cantilevers auf einen NLC-Puls (b) zeigt bei der Auftragung gegen die Spannung ebenso wie die kurz zuvor mit einem Lock-in-Puls gemessene Kapazität (blau) einen linearen Zusammenhang (c).

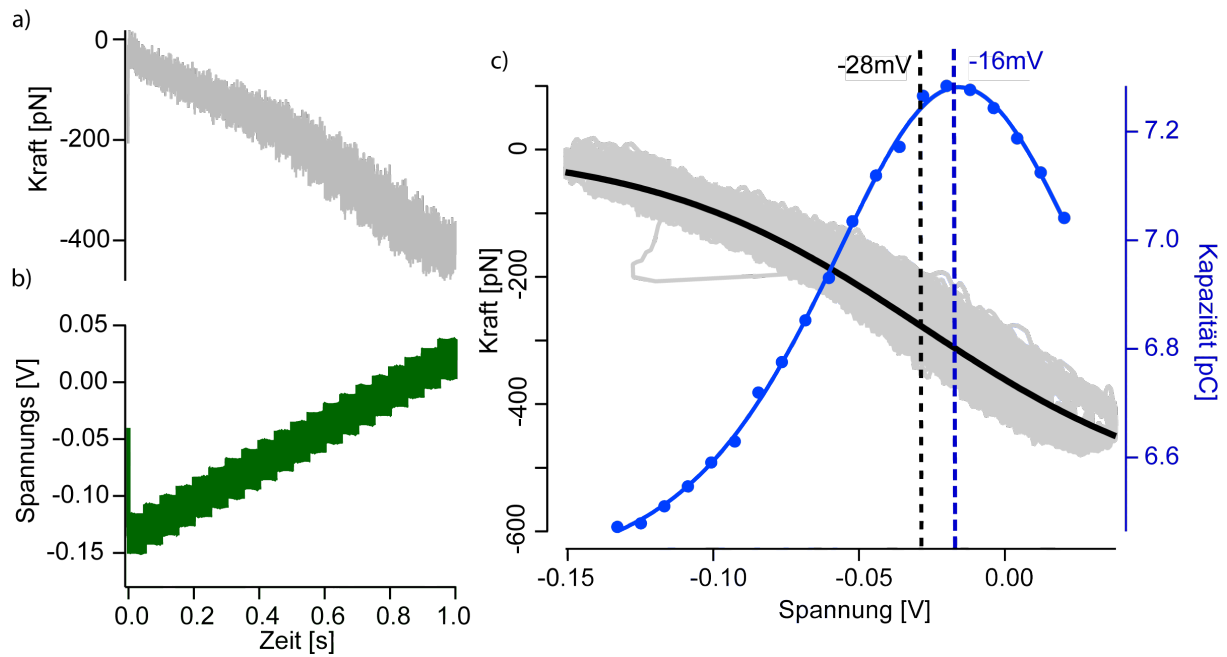


Abbildung 27 – Reaktion einer HEK-Prestinzelle auf die Lock-in-Treppe. Die Kraftentwicklung (a) des Cantilevers in Folge des treppenförmigen Spannungspulses (b) deutet den sigmoidalen Verlauf der Kraft-Spannungsverlauf an. Im steileren Bereich der Kurve, der mit dem aktivsten Bereich des Prestins zusammenfällt, kann man eine Verbreiterung des Kraftplots erkennen, was auf eine verstärkte Reaktion zurückzuführen ist. Die Auftragung der Cantileverkraft gegen die Spannung (c) und ein Vergleich mit der aus den Stromwerten bestimmten NLC, lässt eine Übereinstimmung der Position des NLC-Peaks mit dem Steigungsmaximums der Kraftkurve vermuten. Entsprechende Fits der beiden Kurven (Gleichungen (3)(4) zeigen eine Abweichung der V_h -Werte von 12 mV wobei der NLC-Wert in depolarisierte Richtung verschoben ist. Fit-Werte: Kraftkurve K_{max} 0,6 nN; α 41 mV; V_h -28 mV, Kapazität C_0 6.5pC; Q_{max} 73 fC; α 37 mV; V_h -16 mV.

Die Ungenauigkeit der Spannungsrampenmethode bei der Vermessung des Kapazitätsverlaufs erfordert es, für die genauere simultane Vermessung der elektrischen und mechanischen Eigenschaften den Lock-in-Puls zu benutzen. Dieser hat den Nachteil, dass aufgrund der erforderlichen Sinusspannung ein breiter Spannungsbereich simultan vermessen wird, um den Kapazitätswert bei einem Spannungswert zu erhalten. Außerdem ist die Spannungsaufösung durch die Stufenhöhe begrenzt. Die Höhe von 8,1 mV in einem Bereich von ca. 150 mV reicht aber aus, um die Glockenfunktion der nichtlinearen Kapazität hinreichend genau festzulegen. Der Vorteil liegt in der Möglichkeit, tatsächlich gleichzeitig die spannungsabhängige Bewegung und Kapazität zu bestimmen. Die ermittelten Messwerte an einer HEK-Prestinzelle sind in Abbildung 27 dargestellt. Aus der Kraftkurve lässt sich direkt die sigmoidale Charakteristik herauslesen. Die Krümmung des Graphen hat die Form einer Hälfte der S-förmigen Boltzmannfunktion. Zusätzlich kann man deutlich eine Verbreiterung der Kurve im steileren Bereich erkennen. Hier ist der aktivere Spannungsbereich von Prestin zu finden, der mit der Halbwertsspannung der späteren Fits übereinstimmen sollte. Die Kraftantwort auf die Sinusspannung fällt hier aufgrund der höheren Prestinaktivität deutlicher aus, als in den benachbarten Bereichen. Diese Beobachtung bestätigt sich bei der zusätzlichen Betrachtung der simultan gemessenen Kapazität. Die Zone des Maximums der nichtlinearen Kapazität fällt ungefähr mit dem steilsten Bereich des Kraft-Spannungsgraphen zusammen. Der Abgleich der Fitdaten der jeweiligen Funktionen zeigt eine Abweichung der V_h -Werte von ca. 12 mV, wobei der Wert der mechanischen Antwort hier in hyperpolarisierte Richtung verschoben ist. Die Werte für α unterscheiden sich ebenfalls (47 mV für den Kraft-Potentialfit und 31 mV

für den NLC-Fit). Es handelt sich nun um eine tatsächlich simultan gemessene Differenz der elektrischen und mechanischen Signatur von Prestin. Das in Abbildung 27 gezeigte Verhalten konnte an drei verschiedenen Zellen nachgewiesen werden. Die durchschnittliche Differenz der V_h -Werte lag bei (19 ± 6) mV, wobei die mechanischen Werte immer negativer waren als die elektrischen. Die Differenz der α -Werte betrug (15 ± 5) mV (mechanisch (42 ± 6) mV, elektrisch (27 ± 1) mV).

Die beobachteten Unterschiede zwischen der Reaktion des Cantilevers und der nichtlinearen Kapazität wurden nach der Eindrückung des Cantilevers in die Membran (positive mechanische Vorspannung) gemessen. Der Cantilever reagiert bei einer positiven mechanischen Vorspannung mit einem tieferen Eindringen in die Membran bei Hyperpolarisation der Zelle und umgekehrt, bei einer Depolarisation wird er aus der Zelle gedrückt. Drückt man die Spitze des Cantilevers mit einer hohen Kraft (mehrere Nanonewton) oder über einen längeren Zeitraum (ca. 10 s) in die Membran, so lässt er sich beim anschließenden Rückzug von der Oberfläche schlechter lösen. Die Membran haftet an der Spitze. Ist diese Verbindung relativ stark und war die Kontaktfläche groß genug, so kann man die Rückzugsbewegung bei negativer mechanischer Vorspannung stoppen, bevor sich Cantilever und Zelle voneinander getrennt haben. Der Cantilever steht nun unter einer negativen Spannung, er biegt sich nach unten. Legt man nun den Lock-in-Puls an der Zelle an, kann man den entgegengesetzten Effekt zur Eindrückung beobachten: Der Cantilever wird bei Depolarisation in Richtung der Zelle gezogen. Interessanterweise lassen sich hier die gleichen Effekte wie im Fall der Eindrückung beobachten. In Abbildung 28 sind die Zusammenhänge sowohl für den Fall negativer als auch positiver Vorspannungen des Cantilevers dargestellt. Die gezeigte Messung wurde an einer Prestin-Zelle durchgeführt. Ebenso wie bei der Eindrückung kann auch hier eine negative Verschiebung der Kraft-Spannungsantwort im Vergleich zur nichtlinearen Kapazität beobachtet werden.

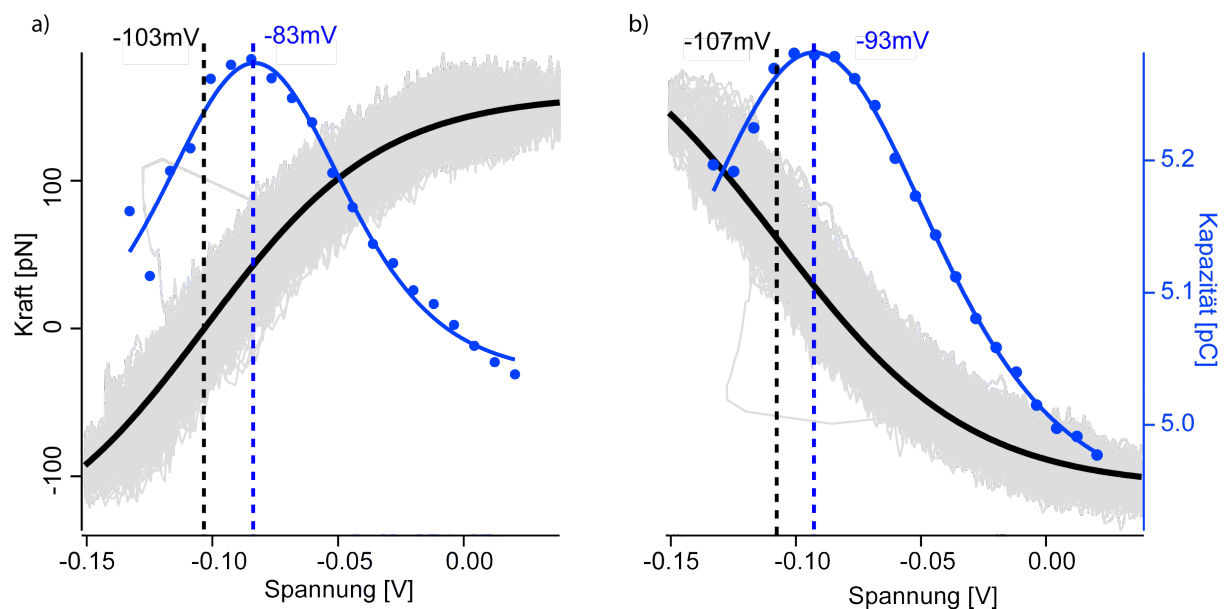


Abbildung 28 – Reaktion des Cantilevers bei negativer und positiver mechanischer Vorspannung an einer Prestinzelle. Trägt man die Kraft des Cantilevers gegen die Spannung des Lock-in-Pulses für einen negativ mechanisch gespannten Cantilever auf (a), so zeigt sich eine horizontale Spiegelung der Verhältnisse bei einer positiven mechanischen Vorspannung (b). Die beiden nacheinander an einer Zelle gemessenen Kurven in (a) und (b) zeigen eine ähnliche Differenz der V_h -Werte des NLCs und der Kraftentwicklung (20 mV bzw. 14 mV) mit jeweils in hyperpolarisierte Richtung verschobenen Werte der Kraftfits.

Anders als bei den Messungen mit den Rampenpulsen sollte die Viskoelastizität mit den hier gemessenen Zeitkonstanten von ca. 7 ms bei der Lock-in-Treppe (Dauer eine Sekunde) keine Rolle spielen. Neue Messungen von Song und Santos-Sacchi [28] zeigen jedoch ebenfalls Differenzen zwischen der Elektromotilität und der nichtlinearen Kapazität. In ihren Experimenten wurden spannungsabhängige Längenänderungen an äußeren Haarzellen vermessen. Die vermessenen Differenzen zeigten Abhängigkeiten von der Rampenlänge, der Rampenrichtung (depolarisierend oder hyperpolarisierend), sowie der Chloridkonzentration, die jeweils intra- und extrazellulär gleich war. Unterschied zu den hier beobachteten Effekten ist ein Verschieben der Elektromotilität in depolarisierte Richtung gegenüber der nichtlinearen Kapazität, die in derselben Größenordnung liegt (ca. 10 mV). Die Versuche wurden unter anderem bei gleicher Rampenrichtung (depolarisierend), gleicher Rampenlänge (eine Sekunde) und ungefähr gleicher intrazellulärer Chloridkonzentration (zwischen 10 mM und 140 mM) durchgeführt. Der einzige Unterschied neben der Messtechnik, ist die Differenz der intra- und extrazellulären Chloridkonzentrationen (64 mM intra und 146 mM extra), die allerdings nicht zu einer Umkehrung des Effekts führen sollte.

Es bleibt festzuhalten, dass mit Hilfe der Lock-in-Technik anhand der Reaktion eines Cantilevers, der in die Zellmembran eindringt oder unter negativer Vorspannung an der Membran haftet, eine Differenz der elektrischen und mechanischen Signatur von Prestin in Form einer Verschiebung der Scheitelwerte V_h beobachtet werden kann. Das simple Modell, welches die Bewegung der Sensordomäne von Prestin instantan mit einer Konformationsänderung koppelt, kann diese Beobachtungen nicht erklären.

Variation der Eindrückkraft

Die in den folgenden Abbildungen gezeigten Graphen enthalten aus Gründen der Übersichtlichkeit keine Fehlerbalken. Der Fehler der Messwerte beträgt für die Eindrückkraft ca. 30 pN (Rauschen, Drift), für die Eindrücktiefe ca. 50-100 nm (nachkriechen, Kontaktpunktungenauigkeit) und für die Reaktionswerte ca. 50-100 pN/V (Standardabweichung aus den ermittelten Werten der direkt nacheinander angelegten Spannungsrampen).

Die Messung der Zellreaktion bei verschiedenen Eindrückkräften erwies sich als schwieriges Unterfangen. Das Zeitfenster für Experimente an gepatchten Zellen hängt im wesentlichen von der Entwicklung des Abdichtwiderstands ab. Fällt dieser auf Werte unter einem halben bis einem Gigaohm werden, die elektrischen Messungen empfindlich gestört (vgl. Abbildung 21). Das wiederholte Eindringen der Cantileverspitze in die Zelle bedeutet, insbesondere bei hohen Eindrückkräften von mehreren Nanonewton, eine zusätzliche Belastung der Abdichtung. Auch wenn sich der Membranwiderstand als relativ robust gegenüber mechanischen Störungen erwies, wurde das Zeitfenster der Messungen hierdurch verkürzt. Eine erfolgreiche Aufnahme von Messwerten bei variablen Eindrückkräften zwischen 0,2 nN und 5 nN ist bei insgesamt ca. 10 Zellen erfolgreich gewesen, wobei die Kräfte nicht immer den kompletten Bereich überspannt haben. Sowohl HEK-WT- als auch HEK-Prestinzellen zeigten dabei größtenteils ein inkonsistentes Verhalten.

Die in Abbildung 29 gezeigten Zusammenhänge zwischen den Messgrößen Reaktion, Eindrücktiefe und Eindrückkraft einer HEK-WT-Zelle können nicht zusammenhängend interpretiert werden. Die Daten, die während der ersten Phase einer von 1 nN absteigenden Kraftrampe aufgenommen wurden, weisen eine andere Charakteristik als

die darauffolgend gemessenen Werte auf (auf- und absteigende Kraframpen bis 3 nN). Interpretiert man den zweiten Teil der Messung separat, erhält man folgendes Bild: Der zwischen Reaktion und Eindrücktiefe vermutete lineare Zusammenhang kann bedingt bestätigt werden. Ein linearer Fit repräsentiert die Daten ebenso gut wie ein Fit einer Wurzelfunktion. Vergleichbar verhält es sich bei den Zusammenhängen zwischen Eindrückkraft und -tiefe sowie Reaktion und Eindrückkraft. Ein linearer Fit passt hier ähnlich gut zu den Daten wie ein quadratischer bzw. wurzelförmiger. Die gemessenen Daten erlauben keine scharfe und konsistente Interpretation. Der Fakt, dass sich der Datensatz in zwei offensichtlich verschiedene Bereiche aufteilt, unterstützt diese Aussage.

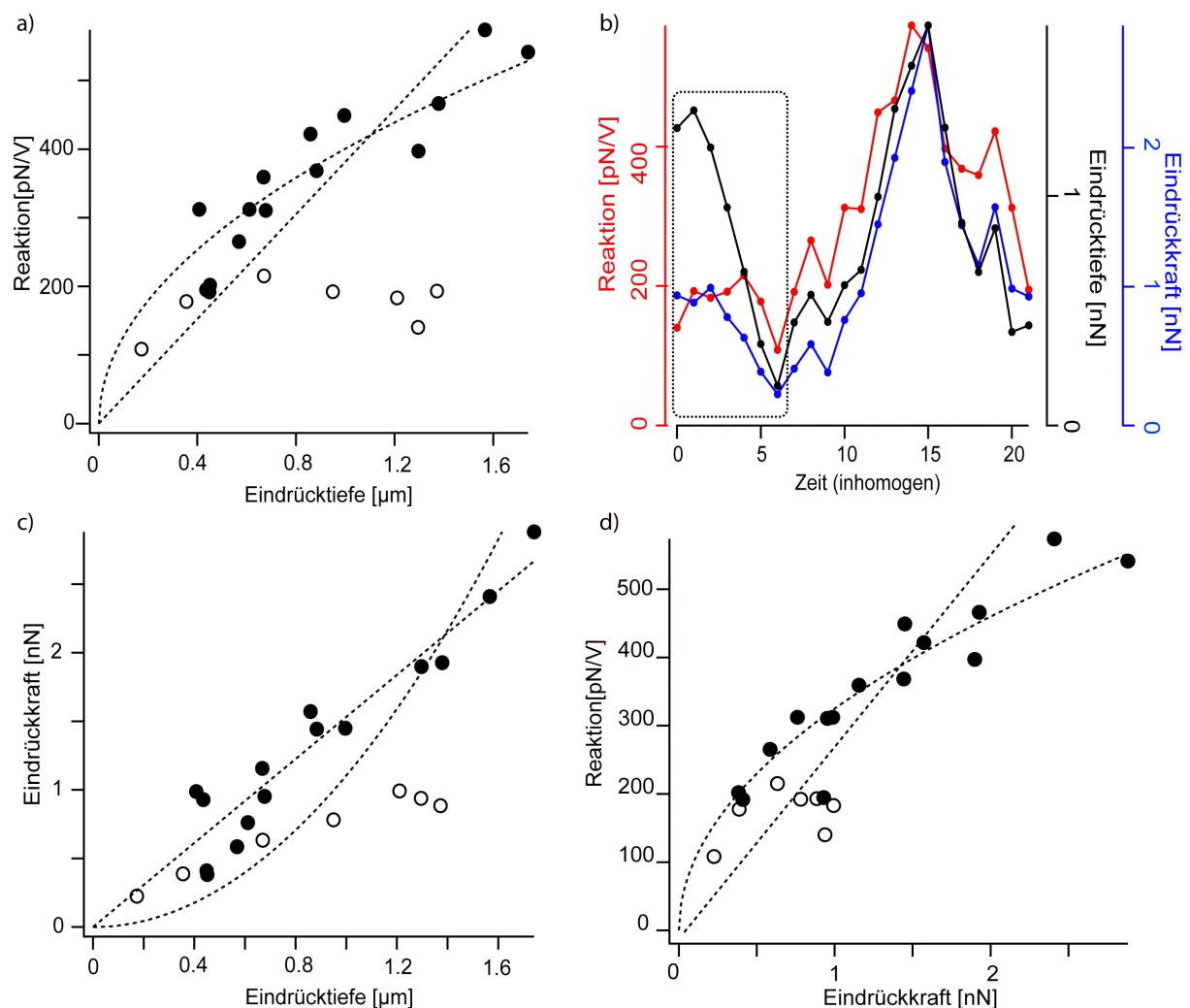


Abbildung 29 – Variation der Eindrückkraft bei einer HEK-WT-Zelle. Die Auftragung der Reaktionswerte gegen die Eindrücktiefe (a) lässt sich in zwei separat zu interpretierende Datensätze einteilen. Die Separation erfolgt dabei anhand der Aufnahmezeit der Daten (markierter Bereich in (b)). Die anfangs gemessenen Daten (offene Kreise) weisen eine relativ konstante Reaktionsamplitude bei unterschiedlicher Eindrücktiefe auf. Auch bei der Auftragung gegen die Eindrückkraft (d) zeigen sie keine große Variationen. Der Kraft-Positionsplot (c) weist einen flacheren Zusammenhang auf als die im zweiten Teil des Experiments gemessenen Daten (volle Kreise). Sowohl der Reaktions-Positions- (a) und Reaktions-Kraft-Plot (d) als auch die Kraft-Abstands-Kurve dieser zweiten Datenmenge könnten mit einem linearen oder wurzelförmigen interpretiert werden.

Ähnlich verhält es sich mit den HEK-Prestinzellen, wie in Abbildung 30 zu sehen ist. Die Messwerte einer dargestellten Zelle können sehr gut mit dem elastischen Hertz-Modell erklärt werden. Durch den quadratischen Zusammenhang zwischen Eindrückkraft und -tiefe und die lineare Abhängigkeit der Reaktion von der Eindrücktiefe besteht ein fast perfektes wurzelförmiges Verhältnis zwischen Reaktion und Eindrückkraft. Die ebenfalls dargestellten Zusammenhänge einer zweiten Prestinzelle zeigen ein komplett anderes Bild. Der quadratische Zusammenhang zwischen Kraft und Tiefe bei der Eindrückung zeigt, wie bei der ersten Zelle auch schon, ein vom Hertzmodell gut beschriebenes elastisches Verhalten. Die Graphen zur Darstellung der Zusammenhänge mit der Reaktion lassen allerdings absolut keinen konsistenten Zusammenhang erkennen. Es zeigt sich ein relativ diffuses Bild.

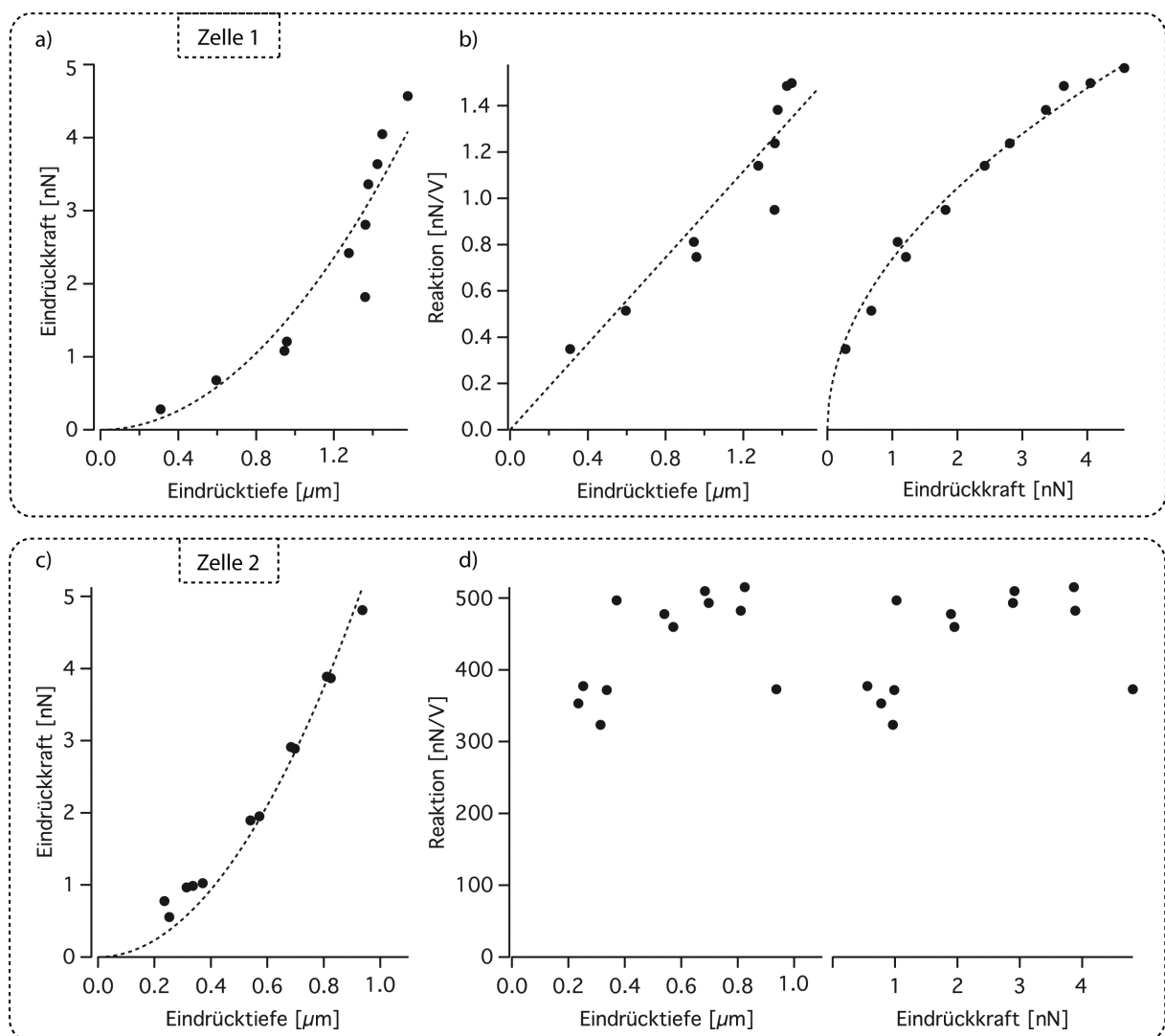


Abbildung 30 – Variation der Eindrückkraft an HEK-Prestinzellen. Trotz ähnlicher Zusammenhänge der beiden Zellen in den Kraft-Abstands-Kurven (a,c), die einen parabelförmigen Charakter aufweisen (Hertz-Modell), sind in den Reaktionsplots (Tiefe und Kraft (b,d)) keine Übereinstimmungen mehr zu erkennen. Zelle 1 kann insgesamt durch ein Hertz-Modell charakterisiert werden (linearer Reaktion-Tiefe- und wurzelförmiger Reaktions-Kraft-Zusammenhang) während, die Datenpunkte der Zelle 2 in beiden Reaktionsplots eine diffuse Verteilung aufweisen.

Die illustrierten Zelldaten der Experimente mit variablen Eindrückkräften zeigen beispielhaft die Inhomogenität des gesamten Datensatzes. Um aus dem Vergleich zwischen HEK-WT- und HEK-Prestindaten Informationen über die Funktionsweise des Proteins Prestin herauszufiltern, sind die durchgeführten Experimente auf den ersten Blick daher nicht geeignet. Als Gründe kommen sowohl zeitlich als auch räumliche Unterschiede in der Eindrückgeometrie in Frage. Das könnte an der Inhomogenität der Zelloberfläche liegen, die bei einem lebenden Organismus zusätzlich eine zeitliche Komponente bekommt. Bei Prestinzellen könnte im Speziellen die Inhomogenität der Oberfläche von unterschiedlichen Prestinkonzentrationen oder Prestinanordnungen (strukturiert oder diffus) herrühren.

Konstante Eindrückkraft

Ähnliche Ergebnisse wie bei der Begutachtung der Experimente mit unterschiedlicher Eindrückkraft erhält man, wenn man den Cantilever wiederholt mit der gleichen Kraft in eine Zelle eindrückt und die Reaktion vermisst. Viele Zellen zeigen trotz konstanter Kraft unterschiedliche Eindrücktiefen und wahrscheinlich deswegen auch unterschiedliche Reaktionen. Andere Zellen weisen trotz nahezu identischer Eindrücktiefe variable Reaktionen auf. Ein solcher Fall ist in Abbildung 31 zu sehen. Die Eindrückung erfolgte an der gleichen Stelle und weist Reaktionswerte zwischen 0,6 nN/V und 1,1 nN/V auf. Dabei scheint es, als ob sich die Reaktionswerte in zwei distinkte Populationen aufteilen. Ein zeitlicher Zusammenhang konnte nicht beobachtet werden. Die Verteilung der Reaktionswerte trotz konstanter Eindrückparameter zeigt, dass der genaue Beitrag von Prestin zur spannungsinduzierten Membranbewegung mit Messungen an einzelnen Zellen nicht eindeutig bestimmt werden kann.

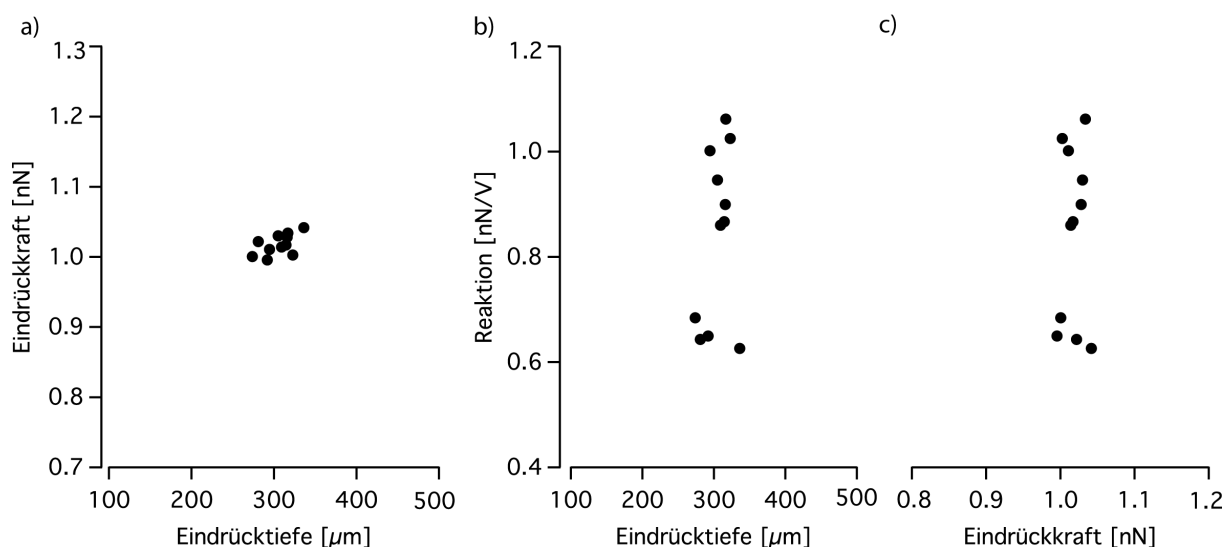


Abbildung 31 – Wiederholte Eindrückung des Cantilevers mit konstanter Kraft in eine HEK-Prestinzelle. Die Eindrückkraft und -tiefe ist in allen Versuchen nahezu identisch (a). Da in den direkt aufeinanderfolgenden Versuchen unterschiedliche Reaktionen gemessen wurden, zeigt die Auftragung gegen die Eindrücktiefe (b) und Eindrückkraft (c) ein Verschmieren der Reaktion der in (a) punktförmigen Datenverteilung. Die Messpunkte spalten sich hier grob in zwei Populationen auf.

Variation der Eindrücktiefe

Konsequenterweise müsste man Untersuchungen mit konstanter sowie variabler Eindrücktiefe durchführen. Da man in den Erklärungsmodellen von dem entscheidenden Faktor des Kontaktumkreises der die Spitze umschließenden Membran ausgeht und dieser sowohl in den elastischen als auch viskoelastischen Modellen linear mit der Eindrücktiefe zusammenhängt, ist eine systematische Variation der Tiefe sogar naheliegender als die Fokussierung auf die Kraft. Die Durchführung scheitert allerdings an der technischen Komplexität dieses Vorhabens. Bei der Einstellung einer Kontaktkraft kann der Controller direkt das Kraftsignal zur Regelung nutzen. Die Regelung der Eindrücktiefe über das Positionssignal des Piezostellelements benötigt die Informationen über den Kontaktpunkt des Kraftsensors mit der Zelle. Die Bestimmung dieses Punktes erfordert allerdings eine Analyse der Positionsdaten, die die Information nur retrospektiv und nicht zeitgleich zur Verfügung stellt. Eine einfache Triggerung auf einen Signalkanal ist also nicht möglich. Um die Reaktion verschiedener Zellen bei einer bestimmten Eindrücktiefe vergleichen zu können, muss die Kraft bei der Untersuchung einzelner Zellen variiert werden, damit in der Gesamtheit statistisch genügend Messpunkte vorliegen. Mit der Zusammenfassung aller Daten aller Experimente wurde eine entsprechende Analyse durchgeführt, die weiter unten beschrieben wird.

Zusammenfassung aller Eindrückversuche

Die Versuche mit unterschiedlichen und konstanten Eindrückkräften haben gezeigt, dass die spannungsinduzierte Membranbewegung schwer zu interpretierende Ergebnisse liefert, wenn man Zellen einzeln betrachtet. Die relevanten Messungen wurden deswegen in eine gemeinsame Datensammlung zusammengefasst, um statistische Informationen zu erhalten. Insgesamt wurden im Rahmen der Kontaktexperimente 110 Zellen mit Hilfe des Cantilevers kontaktiert und versucht Reaktionen zu vermessen. Dabei zeigten von 33 HEK-WT-Zellen 16 (48%) und von 77 HEK-Prestinzellen 42 (55%) Reaktionen von über 150 pN/V. Dieser Schwellwert entspricht bei der zur Reaktionsbestimmung verwendeten Seal-Puls-Breite von ca. 100 mV einer Auslenkung des Cantilevers von 15 pN. Dies ist ungefähr die minimal aufzulösende Kraft im Zellkontakt. Bei einigen Zellen konnten aufgrund von unsauberen Kontaktdaten oder elektrischen Unzulänglichkeiten bestimmte Messparameter wie zum Beispiel die Eindrücktiefe oder Eindrückkraft nicht genau bestimmt werden. Diese Zellen wurden in der folgenden Analyse nicht berücksichtigt. Insgesamt besteht die Datensammlung aus 32 Prestinzellen mit 229 Eindrückversuchen und 14 HEK-WT-Zellen mit 107 Eindrückvorgängen. Die durchschnittliche Kapazität der HEK-WT-Zellen war mit $(5,4 \pm 1,4)$ pF geringer als die der Prestinzellen mit $(9,3 \pm 4,8)$ pF.

In Abbildung 32 sind alle Reaktionen gegen die jeweilige Eindrückkraft aufgetragen. Aufgrund der besseren Übersichtlichkeit sind 15 Datenpunkte, die überhalb von 5 nN/V (Reaktion) und 4 nN (Eindrückkraft) liegen, nicht dargestellt. Der Plot zeigt eine sehr starke Population im Eindrückbereich zwischen ca. 0,5 nN und 1,2 nN. Dies liegt daran, dass bei fast allen Zellen die zuerst getestete Eindrückkraft 1 nN betrug und die variablen Werte der Eindrückrampen immer auch diesen Bereich abdeckten. Weiterhin ist zu erkennen, dass die Werte der HEK-Prestinzellen im Allgemeinen größere Reaktionen hervorrufen können. Die Vergrößerung des markierten Bereichs zeigt außerdem, dass es neben Prestinzellen die eine verstärkte Reaktion zeigen auch solche gibt, die mit HEK-WT-Zellen vergleichbare Reaktionsamplituden aufweisen. Um sich

dies genauer anzuschauen wird weiter in den Bereich mit der höchsten Datendichte, der ungefähr zwischen 0,9 nN und 1,1 nN liegt, gezoomt werden (vgl. Abbildung 33).

Das Histogramm der Reaktionswerte von Eindrucksversuchen in der betrachteten Zone bestätigt das optische Bild der Daten. Neben einem Bereich von ca. 0 nN/V bis 0,6 nN/V in dem sowohl HEK-WT- als auch HEK-Prestinzellen reagieren gibt es bei größeren Reaktionswerten ausschließlich Prestin Datenpunkte, die ein Häufigkeitsmaximum bei ca. 1 nN/V aufweisen. Es scheint zwei unterschiedliche Zonen zu geben in denen sich die Reaktionwerte akkumulieren. Dass es sich bei diesem Effekt nicht um die Folge von unterschiedlichen Expressionsgraden von Prestin handelt, macht die Hervorhebung zweier Beispielszellen in Abbildung 33 deutlich. Ebenso wie schon in Abbildung 31 dargestellt weisen diese Zellen sowohl Datenpunkte über als auch unter der Grenze von ca. 0,6 nN/V auf. Gegen den unterschiedlichen Gesamtgehalt von Prestin als Ursache könnte auch die relativ homogene Prestinexpression der unabhängig von diesen Versuchen mit Hilfe der Lock-in-Technik untersuchten Zellen sprechen. Eine Analyse des Prestin Histogramms zeigt, dass 40% der Daten über und 60% unter dem Schwellwert von 0,6 nN/V liegen.

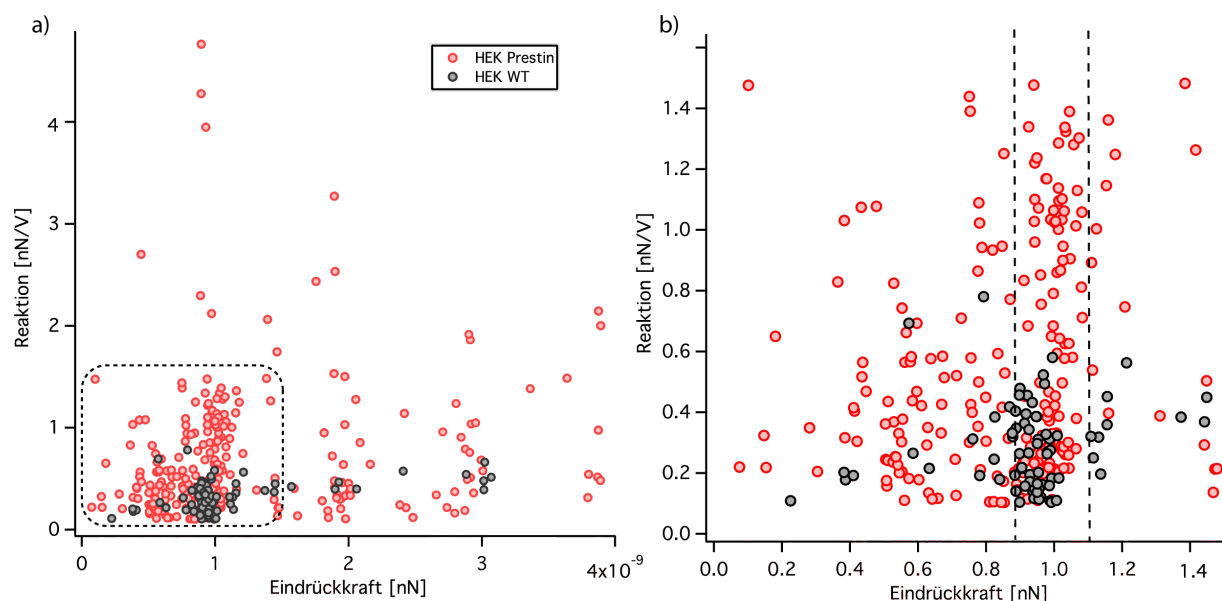


Abbildung 32 – Alle gemessenen Reaktionen aufgetragen gegen die Eindrückkraft. Der Reaktions-Eindrückkraftplot (a) zeigt eine breite Streuung der gemessenen Daten. Eine sehr hohe Datendichte befindet sich im Bereich zwischen 0,6 pN und 1,2 pN. Eine Vergrößerung (b) des in (a) markierten Bereichs zeigt weiterhin eine erhöhte Dichte zwischen 0,9 pN und 1,1 pN. Auffällig sind die insgesamt größeren Reaktionsamplituden der HEK-Prestinzellen. Neben einem Bereich über ca. 0,6 pN/V, in dem ausschließlich Prestin-Zell-Daten zu finden sind, ist eine große gemeinsame Population der WT und Prestin Daten unter diesem Schwellwert zu finden. Der in (b) markierte Bereich wird noch einmal detailliert in Abbildung 33 untersucht.

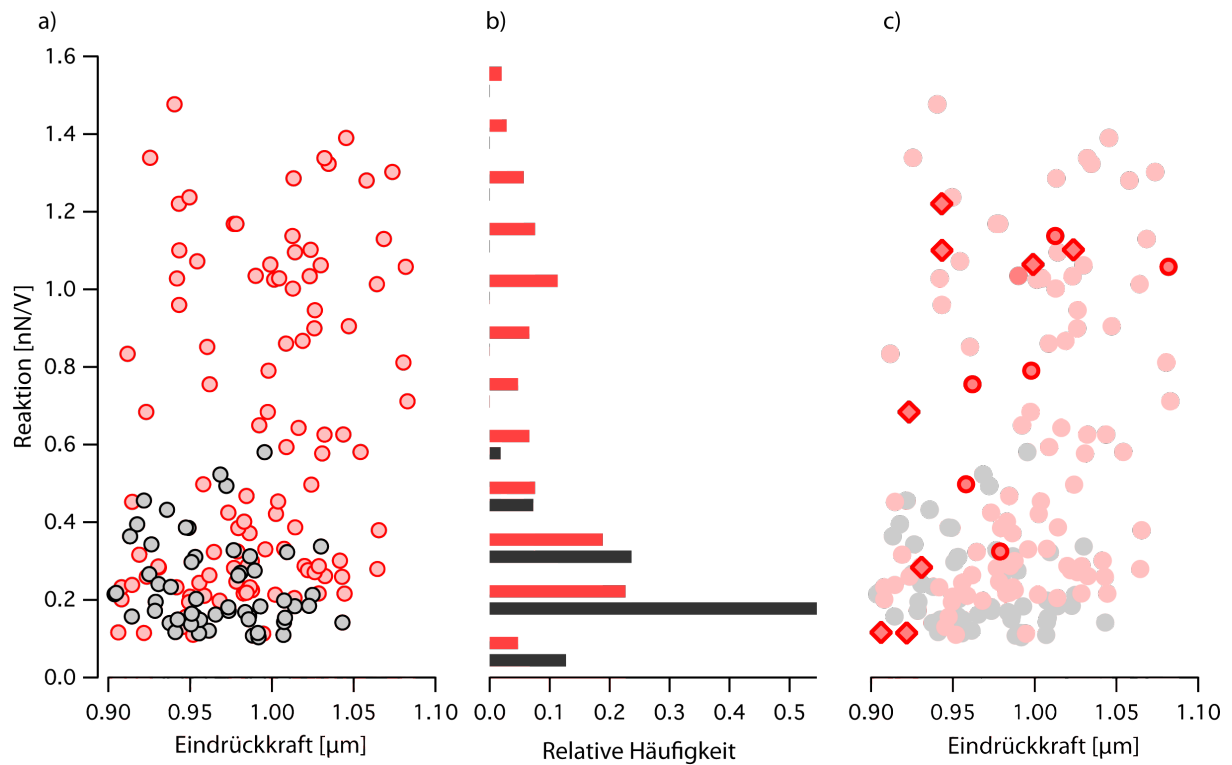


Abbildung 33 – Die Verteilung der Reaktionen für Eindrückkräfte zwischen 0,9 nN und 1,1 nN. Die Vergrößerung des in Abbildung 32 markierten Bereichs (a) lässt sich mit Hilfe von Histogrammen (b) der HEK-WT und HEK-Prestindaten analysieren. Der optische Eindruck der Koexistenz der beiden Datenpopulationen zeigt sich im Bereich unter 0,6 pN/V in Form einer ähnlichen Verteilung. Die relativen Frequenzen sind für die Prestindaten, auf Grund der 40% über 0,6 pN/V liegenden Datenpunkte, kleiner. Die Prestindaten über 0,6 pN/V haben ein Maximum bei ca. 1,0 pN/V. Eine Hervorhebung von zwei Prestinzellen (c) zeigt, dass einzelne Zellen Datenpunkte in beiden getrennten Bereichen aufweisen können.

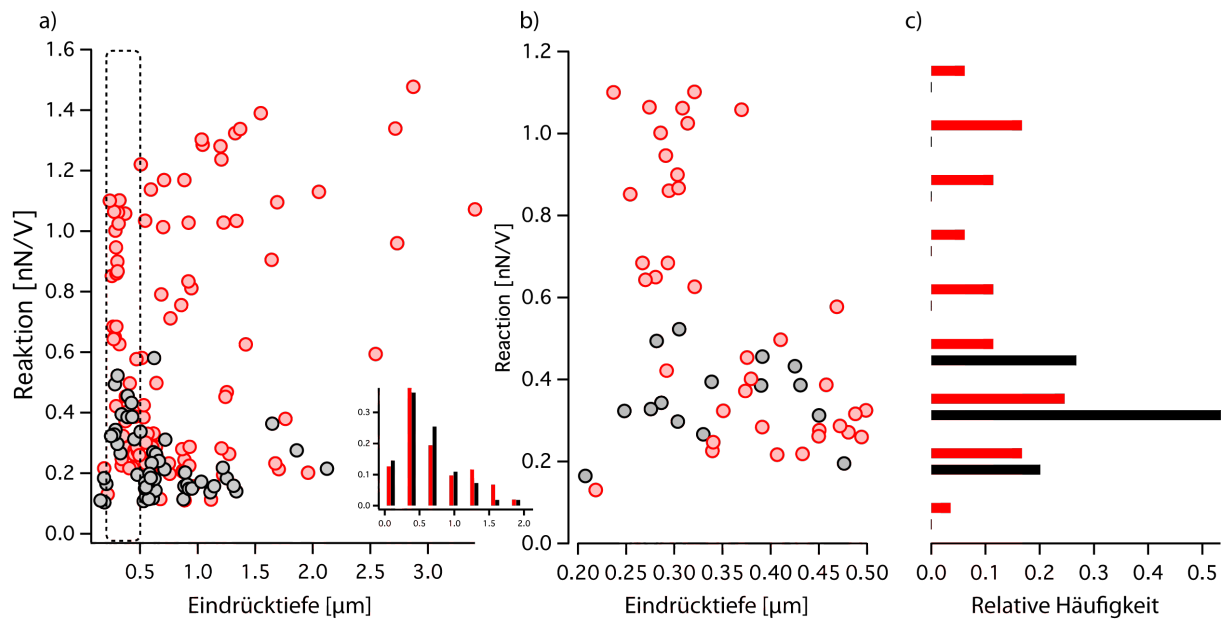


Abbildung 34 – Reaktions- und Eindrücktiefen der Experimente mit Eindrückkräften zwischen 0,9 nN und 1,1 nN (vgl. Abbildung 33). Die Verteilung der Eindrücktiefen (a) des in Abbildung 33 dargestellten Datenensembles zeigt eine breite Streuung mit einer maximalen Dichte zwischen 0,2 μm und 0,5 μm . Die Histogramme bezüglich der Eindrücktiefe zeigen keine signifikanten Differenzen. Eine Vergrößerung der Subpopulation des in (a) markierten dichtesten Bereiches (b) und die entsprechenden Histogramme der Reaktionswerte (c) zeigen ein zu den Stammdaten fast identisches Bild. Neben den ähnlichen Daten unter 0,6 pN/V existiert eine Prestin-Population über diesem Schwellwert, in dem 37% der Prestindaten mit einem Maximum bei 1,0 pN/V liegen.

Um einen versteckten Zusammenhang der beobachteten Verteilung mit der jeweiligen Eindrücktiefe auszuschließen, muss man die vorselektierten Daten dahingehend untersuchen. In Abbildung 34 sind die Datenpunkte aus Abbildung 33 gegen die Eindrücktiefe aufgetragen. Die Verteilung bezüglich der Eindrückung weist keine ausgeprägte Asymmetrie auf, die die Charakteristika der Graphen aus Abbildung 33 bedingen würde. Wählt man wiederum den Bereich der höchsten Datendichte und untersucht diese Subpopulation hinsichtlich der Verteilung ihrer Reaktionswerte, reproduziert sich das aus dem ursprünglichen Datensatz bekannte Bild mit zwei Ansammlungen um die Werte 0,3 nN/V und 1,0 nN/V. Der obere und untere Reaktionsbereich beinhaltet 37% bzw. 63% der Prestin Datenpunkte.

Der Zusammenhang zwischen der Eindrücktiefe und der Reaktion bei allen vorgenommenen Experimenten ist in Abbildung 35 dargestellt. Anders als bei der Auftragung gegen die Kraft (Abbildung 32) sind hier die Datenpunkte etwas weiter gestreut. Es existieren auch hier dichtere Ansammlungen von Wertepaaren, allerdings nicht vergleichbar mit den entsprechenden Dichten bei 1 nN. Die größeren Reaktionswerte über 1,5 nN/V scheinen mit der Eindrücktiefe zu steigen. Sie zeigen somit die eigentlich für die gesamten Werte erwartete Tendenz. Lässt man diese Messpunkte außen vor und bildet ein Histogramm des gesamten recht homogen erscheinenden Bereichs zwischen 0 nN/V und 1,6 nN/V, so gibt es wieder einen Zone der Koexistenz von HEK-WT- und HEK-Prestindaten, die sich zwischen 0 nN/V und 0,6 nN/V befindet. Außerhalb dieses Bereichs befinden sich 33% der Prestindatenpunkte (37% wenn man die vorher außer Acht gelassenen Reaktionswerte über 1,6 nN/V mit einbezieht), die ihren Peak bei 1,0 nN/V haben. Es ergibt sich ein Bild, das in seinem Charakter dem oben beschriebenen Pendant bei den Eindrückkräften ähnelt. Um den Einfluss einer mit der Eindrücktiefe steigenden Reaktion zu eliminieren,

kann man einen bestimmten Bereich separat betrachten. Als Zone bietet sich wieder der Bereich mit der höchsten Datendichte an, der sich in diesem Fall zwischen ca. 0,2 μm und 0,5 μm befindet. Der entsprechende Graph, das Pendant zu Abbildung 33, befindet sich in Abbildung 36.

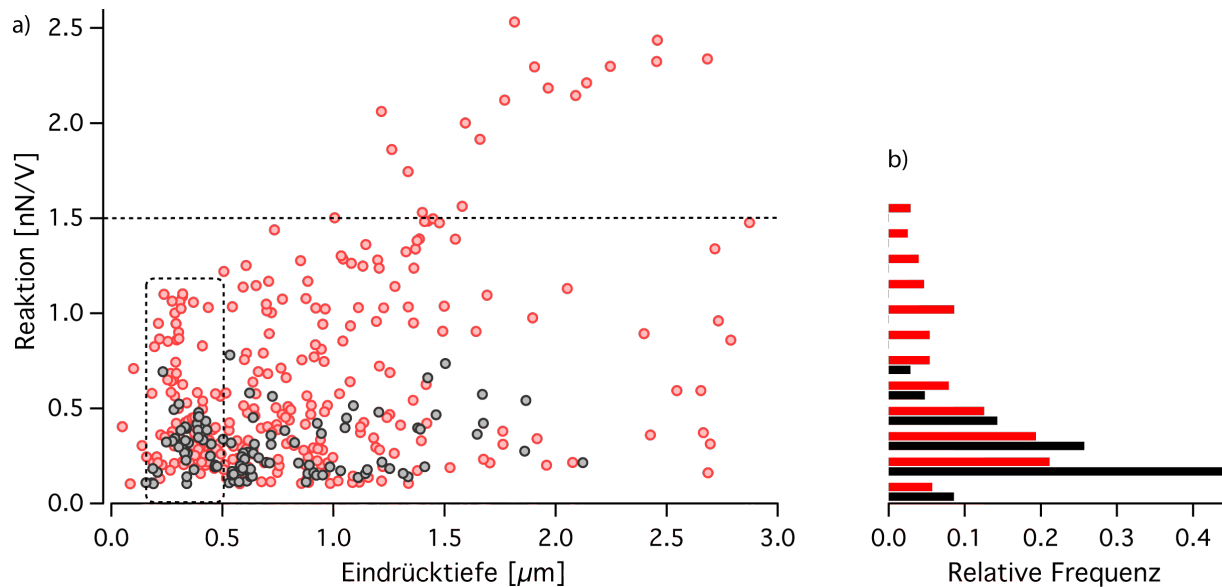


Abbildung 35 – Alle gemessenen Reaktionen aufgetragen gegen die Eindrücktiefe. Die Datenverteilung hinsichtlich der Reaktion und der Eindrücktiefe (a) zeigt eine breitere Streuung als das Pendant der Eindrückkräfte (vgl. Abbildung 32). Die Werte über 1,5 nN/V scheinen linear mit der Eindrücktiefe zu steigen. Ein Histogramm der gesamten Werte (b) unter 1,5 nN/V zeigt das bereits aus Abbildung 33 und Abbildung 34 bekannte Bild. Diesmal liegen etwa 33% der Prestindaten über 0,6 pN/V. Die Subpopulation des markierten dichtesten Bereich wird in Abbildung 36 beleuchtet.

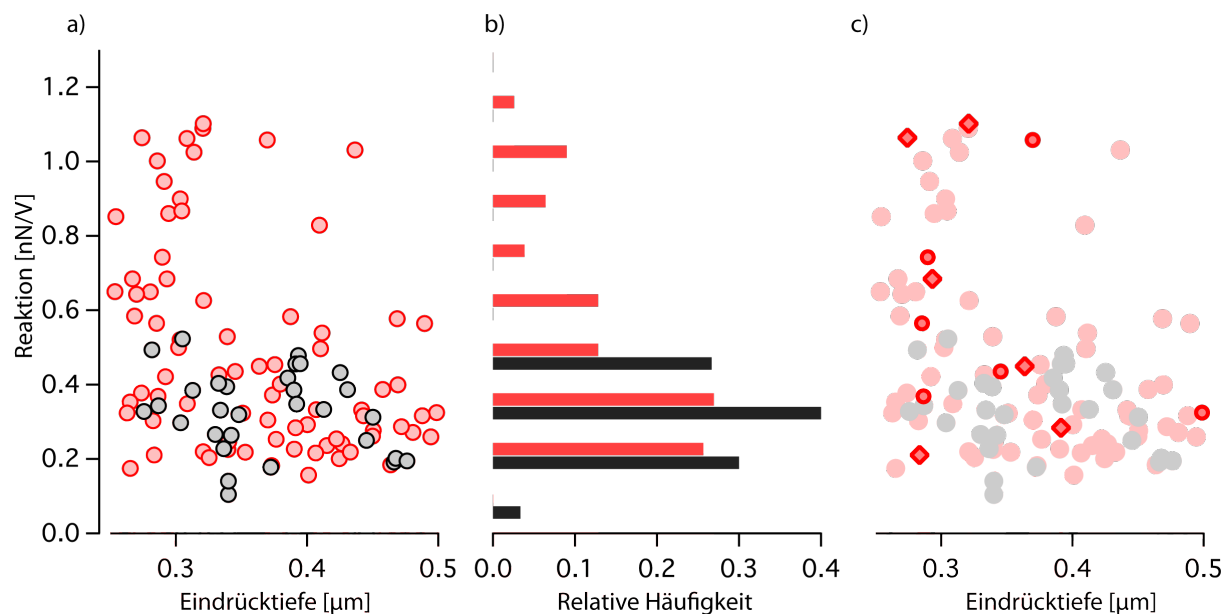


Abbildung 36 – Reaktion- und Eindrücktiefen der Experimente mit Eindrücktiefen zwischen 0,2 μm und 0,5 μm (a)(vgl. Abbildung 35). Die Histogramme (b) der anhand der Eindrücktiefen selektierten Daten zeigen erneut das bekannte Bild (gemeinsame WT und Prestin Population unter 0,6 pN/V und Maximum der Prestindaten darüber bei ca. 1,0 pN/V). Diesmal liegen 22% der Prestindaten über 0,6 pN/V. Wie auch in Abbildung 33 schon können Prestinzellen in diesem Ensemble gefunden werden, die Reaktionen sowohl über als auch unter dem Schwellwert zeigen (c).

Wieder zeigt sich das nun bekannte Bild der zwei mehr oder weniger distinkten Ansammlungen von Prestin-Datenpunkten unter und über einem Grenzwert von ca. 0,6 nN/V (Prestinwertverteilung 22% zu 78%). Es finden sich auch wieder Prestinzellen in dem dargestellten Ensemble, die Werte in beiden Bereichen vorweisen, was durch die Hervorhebung der Daten zweier Beispielszellen verdeutlicht wird.

Eine Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der Kapazität der Zellen und ihrer durchschnittlichen Reaktion zeigt keine Korrelation. Die entsprechenden Korrelationskoeffizienten eines linearen Zusammenhangs sind mit 0,18 für HEK-WT- und -0,07 für HEK-Prestinzellen sehr gering.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Prestinzellen teilweise Reaktionswerte vergleichbar mit denen von HEK-WT-Zellen aufweisen wie auch verstärkte. Die Reaktionswerte variieren unter den Zellen, zusätzlich zeigen einzelne Zellen an sich bereits eine große Variation der gemessenen Werte, was auch in den Messungen bei variablen Eindrücktiefen beobachtet werden konnte. Insgesamt kann man feststellen, dass etwa 1/3 der Reaktionswerte von Prestinzellen über dem Schwellenwert von 0,6 nN/V und 2/3 darunter liegen. Aufgrund der geringen Größe der Reaktionen im Koexistenzbereich von WT- und Prestinzellen unter 0,6 nN/V war es hier nicht möglich, eine sigmoidale von der linearen Form der spannungsabhängigen Kraftentwicklung zu unterscheiden. Die breite Streuung der Prestindaten wie auch die Aufteilung in zwei Populationen gibt einen Hinweis darauf, dass Prestin in der Membran inhomogen verteilt ist (vgl. Abbildung 3). Eine weiterführende Interpretation der Daten erfolgt im Kapitel „Vergleich der Eindrück- und Rückzugsexperimente“.

Negative Reaktionen

Im Kapitel über simultane Kraft- und Kapazitätsmessungen wurde bereits beschrieben, dass es möglich ist, eine zum Fall des eingedrückten Cantilevers inverse Reaktion zu beobachten (vgl. Abbildung 28). Ist die Spitze des Kraftsensors in die Membran indentiert wirkt auf den Cantilever eine positive mechanische Vorspannung. Wird die Zelle nun depolarisiert, wechseln die Prestinmoleküle in ihre kompaktere Konformation, die Membran spannt sich und der Cantilever wird aus der Zelle heraus gedrückt. Im Fall einer negativen mechanischen Vorspannung geschieht genau das Gegenteil, die Kontraktion der Membran zieht den Cantilever in Richtung Zelle. Um den Kraftsensor negativ vorzuspannen muss er bei einem Zellkontakt an der Membran adhären. Der darauf folgende Rückzug des Cantilevers muss unterbrochen werden, bevor die Verbindung zur Zelle reißt. Je nachdem wie stark die adhäsiven Kräfte sind, wie groß die Kontaktfläche und -kraft sowie die Distanz beim zurückfahren ist, können sich verschiedene Arten von Verbindungen ausbilden. Die daraus resultierenden unterschiedlichen Reaktionen des Cantilevers auf eine spannungsinduzierte Membranbewegung sind in Abbildung 37 dargestellt.

Löst sich die an der Spitze haftende Membran beim Zurückziehen vom Zytoskelett, ohne selber zu zerreißen, bilden sich Membrantether. Sie zeichnen sich im Kraft-Positionsplot durch eine relativ konstante Kraft aus und lösen sich nacheinander erkennbar durch einen Sprung in den Graphen. Je nachdem wie groß die Adhäsionskräfte und die Kontaktfläche sind variiert die Anzahl dieser Verbindungen. Wird nun ein Rampenpuls an die Zelle angelegt, während es noch verbundene Membrantether gibt, so ist die beschriebene invertierte Reaktion zu beobachten. Sie unterscheidet sich in ihrem Charakter von den Reaktionen bei indentierten Spitzen durch ein deutlich sichtbares

Überschwingen, nachdem die Spannungsrampe bereits wieder beendet ist. Dieses Verhalten kann durch die Viskoelastizität der Membran erklärt werden (vgl. Abbildung 38) und ist genauso wie die Reaktionsamplitude abhängig von der Verbindungskraft. Im Fall des eingedrückten Cantilevers müsste es eigentlich auch zu einem ähnlichen Verhalten kommen, welches aber wahrscheinlich durch das Zytoplasma unterdrückt wird. In sehr seltenen Fällen und nur bei enorm großen Reaktionsstärken kann man auch in den entsprechenden Kraftkurven nach positiver Vorspannung ein solches Nachschwingen erahnen. Cantilever, bei denen die Zellmembran während des Rückzugs noch nicht vom Zytoskelett gelöst wurde (keine konstanten Kraftbereiche während des Zurückfahrens), weisen ebenfalls kein Überschwingen in den Kraftkurve auf.

Den viskoelastischen Charakter der in Abbildung 37 gezeigten Reaktionskurven der Membrantether kann man anhand eines entsprechenden Modells plausibel machen. Die gute Übereinstimmung der gemessenen und berechneten Daten ist in Abbildung 38 zu erkennen.

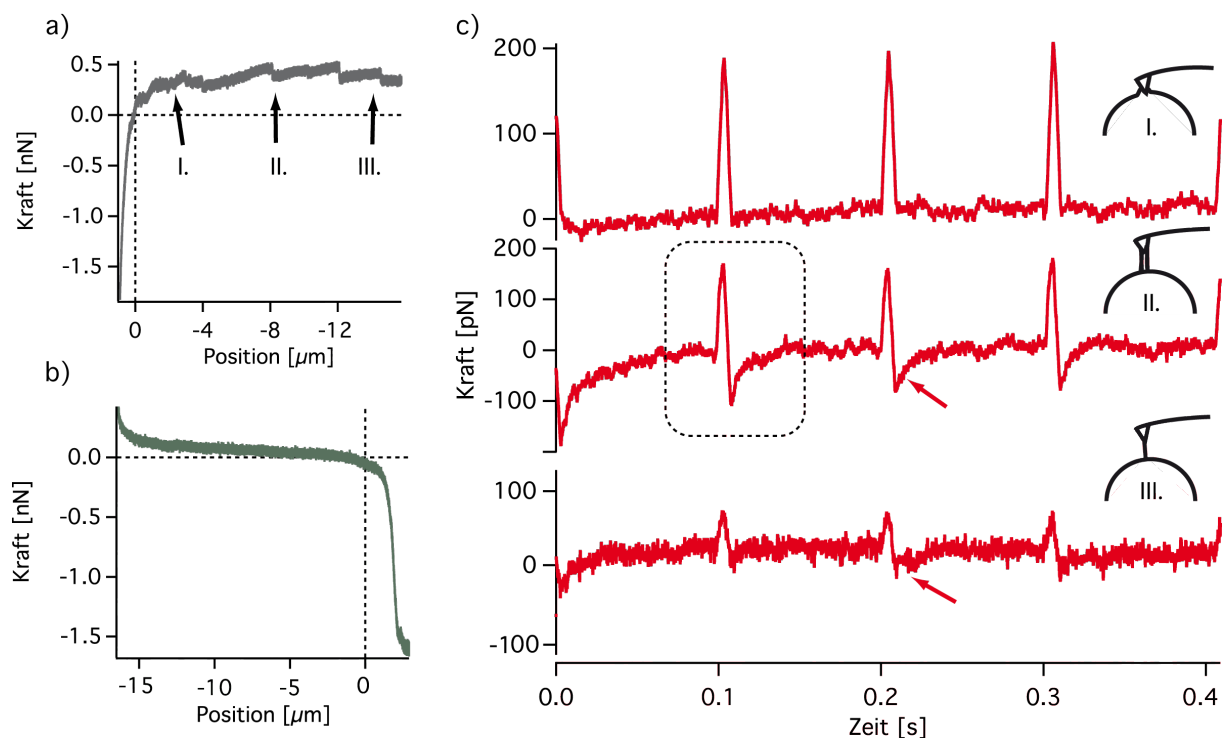


Abbildung 37 – Inverse Reaktionen bei negativer mechanischer Vorspannung des Cantilevers. Werden beim Rückzug des Cantilevers nicht alle Verbindungen getrennt, kann man dies in der Kraft-Abstandskurve des Rückzugs (a) (Kraft-Offsets am Ende) oder einer nachfolgenden Annäherung (b) (Kraft-Offsets am Anfang) der Kraftkurve erkennen. Ist der Cantilever bei der Annäherung der Zelle mit dem Sealpuls durch nicht abgerissene Verbindungen negativ vorgespannt und wurde keine Annäherung an die Zelle vorgenommen, kann man zum eingedrückten Fall inverse Kraftreaktionen messen (c). Diese unterscheiden sich je nach vorhandener Verbindung zur Zelle in ihrem Charakter. Die mit I.-III. gekennzeichneten Kurven stehen für typische Reaktionen nach einem Abbruch des Rückzugs an den in (a) markierten Punkt. Das Nachschwingen (rote Pfeile) in den Kurven II und III wird in Abbildung 38 anhand des in der Spur II markierten Bereichs erläutert.

Das simple Modell geht von einer isometrischen Kraftentwicklung in der Membran aus. Da die Länge der Membrantether im Mikrometerbereich liegt und deswegen um ein Vielfaches größer als die Verbiegung des Cantilevers bei der Kraftdetektion (einige Nanometer) ist, scheint dies ein sinnvoller Ansatz zu sein. Die Konformationsänderung der Prestinmoleküle geschieht gegen die Viskoelastizität der Membran, die durch ein Maxwell-Modell (Federkonstante k , Viskosität η) simuliert wird. Weiterhin wird vereinfacht angenommen, dass die Längenänderung des Prestinensembles instantan und proportional zur elektrischen Spannung erfolgt mit einer maximalen Amplitude von ΔL . Aus der Isometrie folgt, dass der Maxwell-Körper genau mit dieser Längenänderung gedehnt bzw. gestaucht wird. Die Kraftentwicklung, die in diesem System im Laufe einer Anregung der Konformationsänderungen durch beispielsweise den Sealpuls entsteht, wird nun berechnet. Dies geschieht sukzessive, wie im Grundlagenteil beschrieben, mit dem eulerschen Polygonzugverfahrens anhand der Gleichung (55) [71].

$$\frac{dF(t)}{dt} = -\frac{k}{\eta} \left(F(t) - \eta \frac{dz}{dt} \right) \quad (55)$$

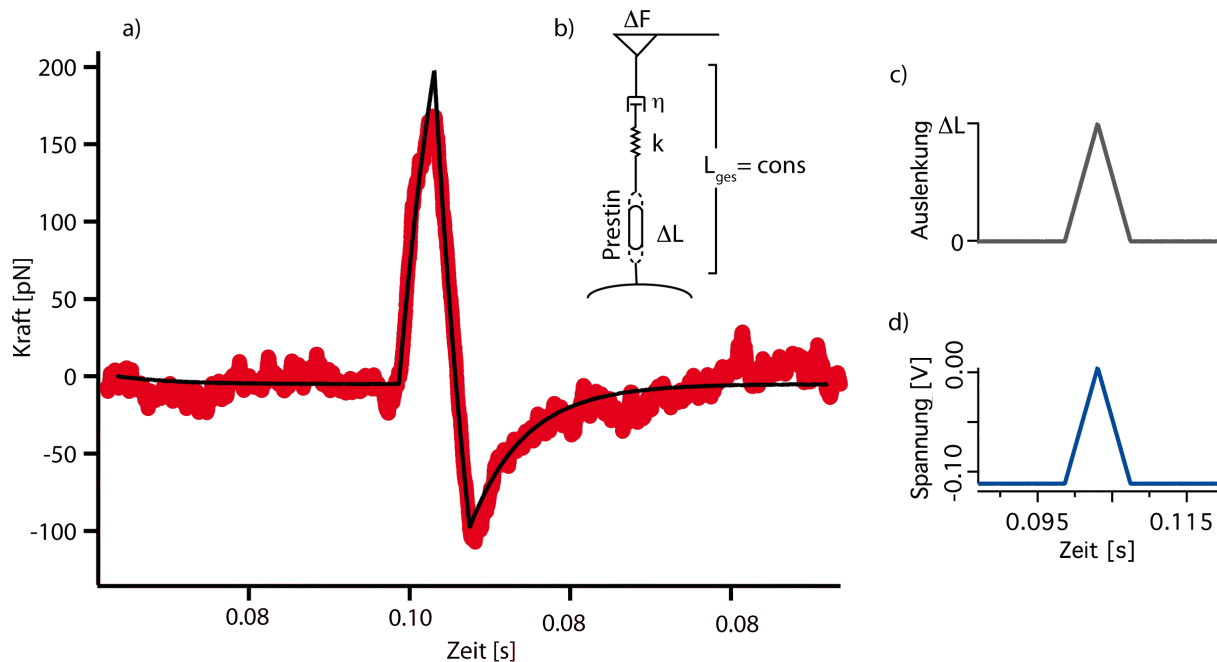


Abbildung 38 – Viskoelastischer Charakter der Kraftantwort bei Bindung durch Membrantether. Die Kraftantwort des Cantilevers, der durch Membrantether mit der Zelle verbunden und negativ vorgespannt ist, zeigt ein viskoelastisches Verhalten ((a), vgl. Abbildung 37), das gut durch Modellierung der Membranviskoelastizität mit Hilfe eines Maxwell-Elements (b) beschrieben werden kann (schwarze Linie in (a)). Die Längenänderung ΔL der Prestinmoleküle (c) wird als proportional zur angelegten Spannung (d) angenommen. Die Werte des Fits sind: $\Delta L = 13 \text{ nm}$, $\eta = 150 \text{ } \mu\text{Ns/m}$ und $k = 20 \text{ mN/m}$. Ein exponentieller Fit im Bereich des Überschwingens (nicht gezeigt) liefert eine Zeitkonstante von $\tau_{ii} = 10 \text{ ms}$.

Die optimalen Parameter werden mit Hilfe des in der Einführung beschriebenen Hooke-Jeeves-Verfahrens ermittelt. Der lineare Zusammenhang zwischen elektrischer Spannung und Längenänderung kann theoretisch beliebig gewählt werden. Entsprechend der gewählten Proportionalität ($\Delta L/\Delta U$) skalieren die gefundenen optimalen Parameter k , und η , mit einer dazugehörigen Kraftantwort, die qualitativ und quantitativ nahezu identisch der in Abbildung 38 ist. Da die maximal produzierte Energie eines Prestinmolekül E_{Pres} bei seiner Konformationsänderung mit der dazugehörigen Längenänderung δ_{Pres} abgeschätzt werden kann, ist es möglich, einen sinnvollen Wert für die Federkonstante k festzulegen ($E_{Pres} = k \delta_{Pres}^2$) [31]. Für $E_{Pres} = 1,2 k_B T$ und $\delta_{Pres} = 0,5$ nm ergibt sich $k = 20$ mN/m. Eine Optimierung der Parameter mit diesem k ergibt die Werte $\eta = 150$ μ Ns/m und $\Delta L = 13$ nm. Die Längenänderung ΔL kann als effektive Längenänderung von N_{Pres} parallel agierenden Prestinmolekülen interpretiert werden. Mit $\delta_{Pres} = 0,5$ nm erhält man $N_{Pres} = 26$. Diese Zahl ist als ein effektiver Wert zu verstehen. Für einen Absolutwert der beteiligten Prestinmoleküle müsste man die Zahl der in Reihe agierenden Moleküle abschätzen. Da bei der Bestimmung für N_{Pres} eine isometrische Kraftentwicklung angenommen wurde kann man die Auslenkung des Cantilevers nicht mehr als Ausgangspunkt der Bestimmung verwenden. Die charakteristische exponentielle Zeitkonstante $\tau_M = \eta/k$ des Maxwell-Modells beschreibt die relaxierende Komponente. Für die ermittelten Werte ergibt sich $\tau_M = 7,5$ ms, die der Zeitkonstante der Relaxation des Überschwingens $\tau_{ii} = 10$ ms entspricht. Für die seltenen Fälle des Überschwingens im Eindrückungsfall können ähnliche Werte ermittelt werden (ca. 10 ms). Santos-Sacchi et al. konnten die zeitliche Entwicklung des V_h -Wertes nach Spannungsänderungen in äußeren Haarzellen ebenfalls durch ein viskoelastisches Verhalten der Membran beschreiben [31]. Das zugrundeliegende Modell bestand aus zwei parallelen Maxwell-Körpern, die ein biexponentielles Relaxationsverhalten beschreiben. Für die hier relevante schnelle Komponente wurden Werte ermittelt, die in den gleichen Größenordnungen wie die hier gefundenen liegen: $k = 5,8$ mN/m, $\eta = 0,35$ mNs/m und $\tau_M = 60$ ms.

Eine systematische Untersuchung von inversen Reaktionen gestaltete sich als schwierig. Das erste Problem besteht in einem definierten Herstellen eines Zustands, in dem der Cantilever noch an der Zelle befestigt und negativ vorgespannt ist. Anders als beim Kontaktieren kann hier kein Messkanal zur Steuerung des Rückzugs bis zu einer bestimmten Vorspannung genutzt werden, da dafür der neutrale Punkt des Cantilevers bekannt sein müsste. Eine Abschätzung ist zu ungenau, um auf die nur kleinen negativen Vorspannungen regeln zu können. Zusätzlich sind die messbaren Reaktionen viel kleiner als dies bei einem indentierten Cantilever der Fall ist. Die in Abbildung 37 gezeigten Beispiele der inversen Reaktion sind eine selten vorgekommene Ausnahme. Da eine Untersuchung speziell von tethergebundenen Cantilevern aufgrund der Ablösung der Membran vom Zytoskelett dennoch interessant ist, wurde ein weiteres Experimentsetup entwickelt, welches eine genauere Untersuchung der Vorgänge und Reaktionen während des Rückzugverfahrens erlaubt.

Frequenzabhängigkeit der Reaktion

Der Ganzzellmodus ist aufgrund seiner elektrischen Eigenschaften eigentlich nicht geeignet, die Reaktion der Membran auf hochfrequente Spannungspulse zu untersuchen. Wie das Ersatzschaltbild in Abbildung 5 zeigt, handelt es sich um einen Tiefpassfilter mit der Zeitkonstanten $\tau = R_A C_M$ (Grenzfrequenz $f_c = 1/2\pi\tau$). Die an der Membran abfallende Spannung wird demnach immer geringer und somit auch die mit dem Cantilever

messbare spannungsinduzierte Bewegung der Membran. Um dennoch die frequenzabhängigkeit der Reaktionen, wenn auch eingeschränkt, zu untersuchen, wurden Sinuspulse mit linear ansteigender Frequenz (bis 5585 Hz) an Zellen angelegt. Die Abschwächung der Reaktion des Cantilevers konnte bei einigen stark reagierenden Zellen bis zu der angelegten maximalen Frequenz verfolgt werden. Als Beispiel ist in Abbildung 39 der gemessene Reaktionsverlauf bei einer negativen mechanischen Vorspannung (vgl. Abbildung 37) dargestellt.

Die Amplitude der Reaktion nimmt während des Pulses, also mit zunehmender Frequenz, stetig ab. Die Fouriertransformierte der Cantileverbewegung zeigt eine deutliche Stufe bei der maximalen Frequenz, was bedeutet, dass die Membranbewegung bis zur angelegten Grenzfrequenz mit dem Cantilever verfolgt werden kann. Diese Stufe kann man allerdings nur deutlich bei stark reagierenden Prestinzellen mit entsprechend kleinen Werten für R_A und C_M erkennen. WT-Zellen haben im Allgemeinen eine zu geringe Anfangsamplitude der Reaktion, um einen entsprechenden Abfall bei der Maximalfrequenz in der Fouriertransformierten zu sehen.

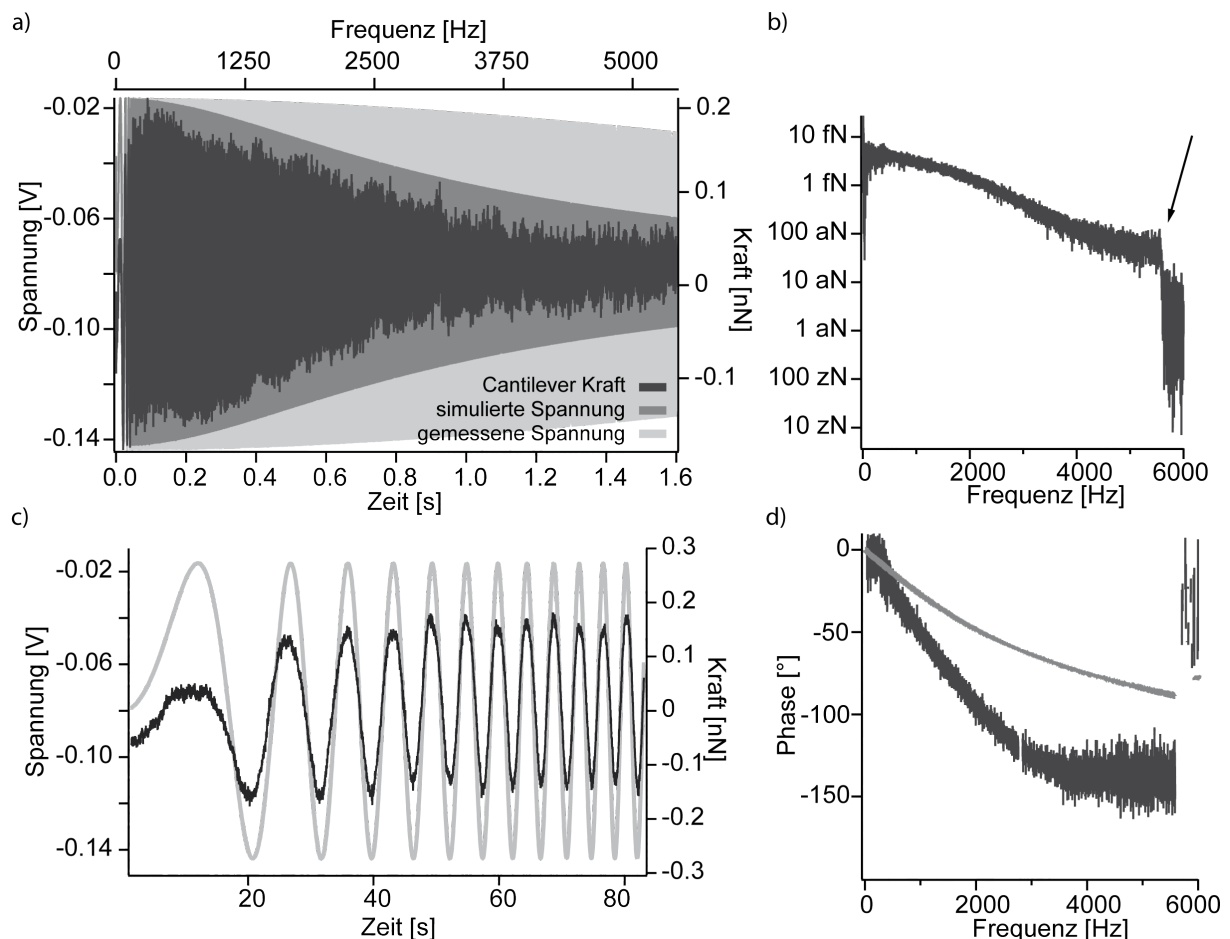


Abbildung 39 – Frequenzabhängigkeit der Reaktion des Cantilevers. Die Reaktion des Cantilevers nimmt mit zunehmender Pulsdauer und Frequenz des Sinuspulses ab (a). Der Hauptgrund für dieses Verhalten liegt in der mit der Frequenz abnehmenden Membranspannung, wie man an dem entsprechend simulierten Spannungsverlauf erkennen kann. Eine Fouriertransformation (b) der Reaktion zeigt, dass die Membranbewegung trotz Abschwächung bis zur maximalen Frequenz von ca. 5600 Hz verfolgt werden kann. Die Phasenanalyse (d) der Signalaare „gemessene Spannung und Reaktion“ sowie „simulierte Spannung und Reaktion“ zeigt eine wachsende Phasendifferenz mit unterschiedlichen Steigungen. Anfänglich folgt die Reaktion der angelegten Spannung noch ohne Zeitverschub (c). Die Zellparameter der untersuchten Zelle waren: $R_A = 9,2 \text{ M}\Omega$; $R_M = 1,2 \text{ G}\Omega$; $C_M = 7,6 \text{ pF}$; $\tau = 70 \text{ }\mu\text{s}$; $f_c = 2276 \text{ Hz}$.

Die tatsächlich an der Membran abfallende Spannung kann nicht direkt gemessen werden. Allerdings kann man die bei der Spannungsrampenmethode verwendete numerische Berechnung der Ströme und Spannungen in der Zelle auch für den angelegten Frequenzpuls benutzen. Als passive Zellparameter verwendet man die mit Hilfe des Sealpulses ermittelten Werte und simuliert die Spannung an der Membran. Das erhaltene Ergebnis stimmt qualitativ sehr gut mit dem Verlauf der Reaktion überein, wie man in Abbildung 39 sehen kann. Eine Phasenanalyse der Verhältnisse zwischen Reaktion und gemessener Spannung sowie zwischen gemessener Spannung und simulierter Membranspannung weist allerdings Unterschiede auf. Die Phasendifferenzen werden jeweils größer, allerdings mit einer unterschiedlichen Steigung. Eine Erklärung wäre, dass es zwischen dem Messkanal des Cantileversignals und dem Spannungssignal einen Zeitunterschied, ähnlich dem zwischen Strom- und Spannungssignal, gibt. Zusätzlich ist die Simulationsmethode auch nicht wirklich geeignet, um bei hochfrequenten Spannungspulsen die richtigen Phasenwerte zu liefern, da von Natur aus die Verwendung des Polygonzugverfahrens die simulierten Werte nur leicht zeitlich versetzt berechnen kann.

Insgesamt kann festgehalten werden, dass man bei stark reagierenden Prestinzellen die spannungsinduzierte Reaktion bis zu Frequenzwerten verfolgen kann, die durch die Zeitkonstante der Ganzzellableitung limitiert sind. Es scheint, als ob die Reaktion keine Abschwächung erfährt außer der durch die abfallende Membranspannung bedingte. Für eine Phasenuntersuchung bedarf es weiterer Justierung, im Speziellen eine Eliminierung der intrinsischen Phasenunterschiede. Die gemessenen Reaktionsverläufe kann man qualitativ gut nachvollziehen, in dem man sich der bereits zur Zellparameterbestimmung genutzten Simulationsmethode bedient.

4.2.2 Messungen mit kontinuierlicher Reaktionsbestimmung

Die kontinuierliche Bestimmung der Bewegungsamplituden des Cantilevers auf rampenförmige Spannungspulse mit einer Wiederholrate von 8.8 ms ermöglicht es auch sehr kleine Änderungen der Reaktionswerte zu verfolgen. Der Fehler der Messmethode wurde empirisch auf ca. 100 pN/V geschätzt. Eine genaue Charakterisierung erfolgt mit der Bestimmung der Werteverteilung bei einem Cantilever ohne Zellkontakt. Die während einer Dauer von 10 s gemessenen Daten zeigen eine gaussförmige Verteilung mit einer Standardabweichung von 67 pN/V (vgl. Abbildung 40).

Der Fehler der gemessenen Mittelwerte verringert sich mit der Wurzel der Anzahl der Messungen. Die im Allgemeinen geringen Reaktionen während des Rückzugs eines adhärennten Cantilevers oder bei der flachen Kontaktierung können mit der Erhöhung der Anzahl der Messungen genauer aufgelöst und die Entwicklung kontinuierlich verfolgt werden.

Da die Steuerung des Piezoelementes während des Eindrückvorgangs über das Cantileversignal erfolgt, könnte es sein, dass die durch die Spannungspulse verursachte Bewegungen durch ein Nachfahren des Cantilevers verringert werden. Zwischen dem Spannungspuls und dem Positionssignal des Cantilevers konnten allerdings keine Korrelationen gefunden werden. Die Regelungsparameter sind also ausreichend langsam eingestellt um eine Verminderung des Reaktionssignals zu verhindern.

Die Ergebnisse, die im Folgenden dargestellt werden, sind an 18 HEK-Prestin- und 4 HEK-WT-Zellen gemessen worden. Durchschnittswerte der mit der Lock-in-Technik gemessenen Zellparameter der Prestinzellen mit der jeweiligen Standardabweichung sind für die Kapazität ($7,3 \pm 4,7$) pF, (925 ± 270) $1/\mu\text{m}^2$ für die Prestindichte (Q_{max} (104 ± 35) fC) und (39 ± 6) mV für α . Die vier untersuchten HEK-WT-Zellen zeigten alle keine nichtlineare Kapazität und sind mit einer Kapazität von $(6,1 \pm 0,8)$ pF wiederum etwas kleiner als die Prestinzellen. Von den HEK-Prestinzellen haben insgesamt nur 7 der 18 Zellen (39%) eine Reaktion des Cantilevers von über 150 pN/V gezeigt, was bei 3 der 4 (75%) der HEK-WT-Zellen der Fall war. Um die gemessenen Zellendaten in das Gesamtbild der bisher gemessenen Zellen (vgl. Abbildung 32) einzuordnen, sind die entsprechenden Datenpunkte in Abbildung 41 separat dargestellt. Die gezeigten Reaktionswerte sind wie im ersten verwendeten Setup nach der Eindrückung anhand eines Sealpulses ermittelt worden.

In den in Abbildung 41 gezeigten Graphen sind zwei Zellen, die sehr stark reagiert haben, hervorgehoben. Eine Zelle zeigt dabei einen relativ linearen Zusammenhang zwischen Reaktion und Eindrücktiefe sowie Eindrückkraft. Die Reaktion der zweiten Zelle weist Reaktionswerte von 1 nN/V bis fast 5 nN/V bei einer gleichbleibenden Eindrückkraft von ca. 1 nN auf. Mit steigender Eindrücktiefe sinkt die Reaktion. Diese Inhomogenität der Daten kann anhand der zusätzlich vorliegenden Reaktionsspuren genauer untersucht werden, was weiter unten getan wird.

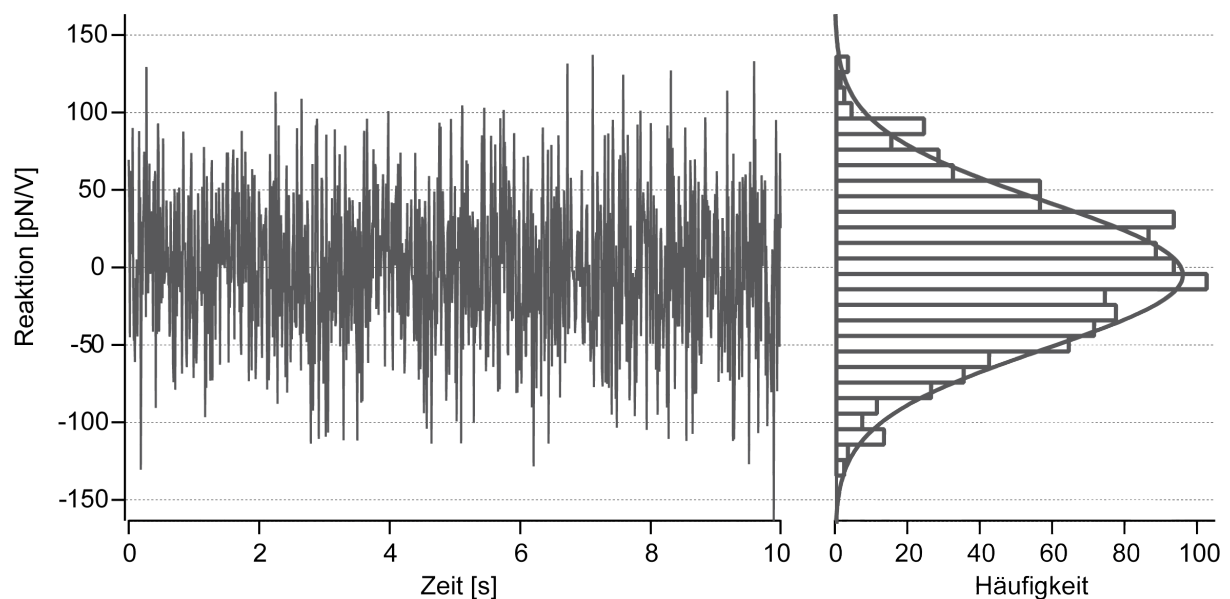


Abbildung 40 – Fehler der Reaktionswertbestimmung. Die Reaktionsspur, bestimmt aus Kraft- und Spannungssignal eines wenige Mikrometer über der Zelle befindlichen freien Cantilevers, zeigt gaussförmig um Null verteilte Werte. Die Breite der Gausskurve beträgt 67 pN/V.

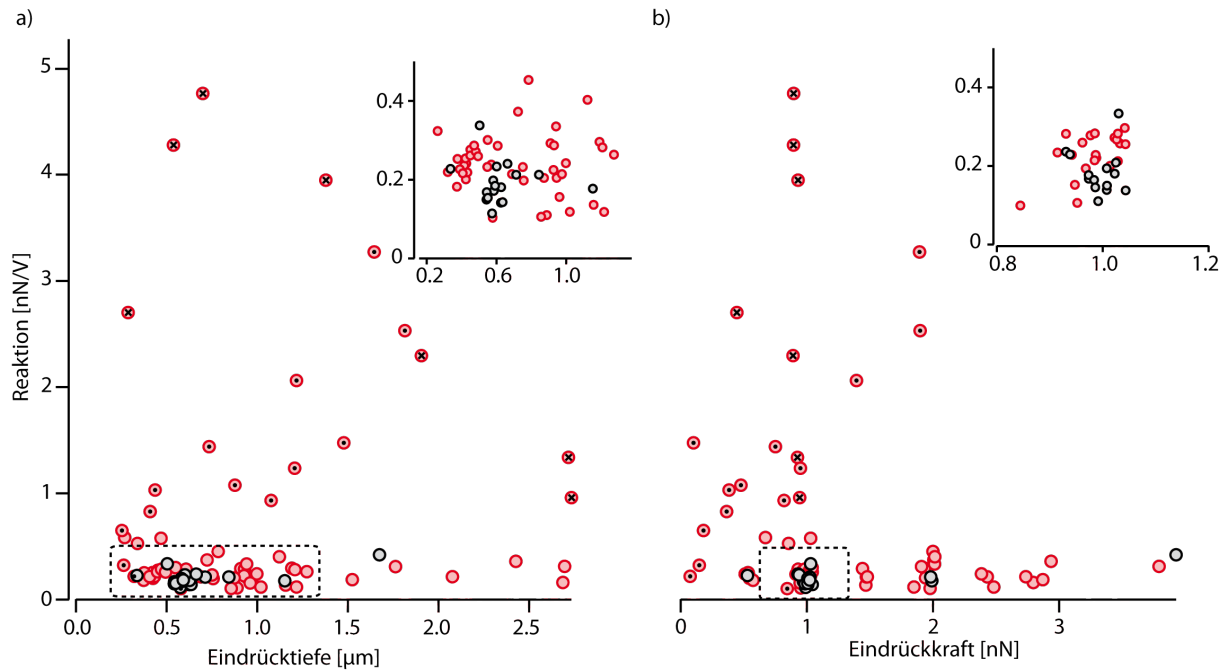


Abbildung 41 – Reaktions-Eindrückstiefe und -kraft-Plots der Eindrückkurven aller mit der zweiten Methode untersuchten Zellen. Sowohl die Auftragung der Reaktionen gegen die Eindrücktiefe (a) als auch Eindrückkraft (b) zeigen eine ähnliche Streuung wie die entsprechenden Plots in Abbildung 32. Der Zoom in die markierten Bereiche zeigt wieder eine gemeinsame Ansammlung von HEK-Prestin- und HEK-WT-Datenpunkten. Hervorgehoben sind die Messpunkte von zwei sehr stark reagierenden Zellen. Während Zelle 1 einen Anstieg der Reaktion mit Erhöhung der Eindrücktiefe und -kraft aufweist, zeigt Zelle 2 einen entgegengesetzten Verlauf in der Tiefenabhängigkeit und eine breite Streuung der Reaktion bei konstanter Eindrückkraft.

Versuche mit Cantilevern ohne Spitze

Mit Hilfe der nun zur Verfügung stehenden sensitiven Reaktionsentwicklungsplots wurde erneut untersucht, welche Kräfte eine globale Deformation der Zelle und die entsprechenden spannungsinduzierten Rückstellkräfte auf den Cantilever ausüben. Die Zellen wurden dazu mit dem flachen Teil des Cantilevers kontaktiert (vgl. Abbildung 42). Die durchschnittliche Andrückkraft war 1 nN die manchmal aufgrund der negativen Auswirkung auf den Seal auf 0,5 nN reduziert wurde. Die ermittelten Reaktionswerte erwiesen sich dabei als relativ unabhängig von der Andrückkraft. Eine typische Reaktionsentwicklung bei einer flachen und im Vergleich dazu die entsprechenden Entwicklungen bei einer spitzer Kontaktierung sind in Abbildung 42 dargestellt.

Wie man erkennen kann, reagiert der Cantilever sobald er im Kontakt zur Zelle steht genau in die entgegengesetzte Richtung als dies bei der Eindrückung der Spitze der Fall ist. Die ermittelten Werte sind alle kleiner als ca. 100 pN/V und liegen damit im Bereich des Fehlers bei einzeln vorgenommenen Messungen. Insgesamt wurden die Reaktionen von jeweils vier HEK-WT- und HEK-Prestinzellen gemessen. Die durchschnittlichen Reaktionswerte waren (-17 ± 13) pN/V für HEK-WT- und (-58 ± 28) pN/V für HEK-Prestinzellen. Prestinzellen weisen daher in diesem Bereich eine ca. 3,4-fach stärkere Reaktion auf als HEK-WT Zellen.

Die geringe Größe der gemessenen Reaktionswerte von unter 100 pN/V begründet das Fehlen einer messbaren Reaktion in den mit Hilfe des ersten Setups durchgeführten äquivalenten Experimenten.

Der Hintergrund für die negativen Reaktionen könnte eine Affinität der Zellmembran zum Cantilever sein. Im Randbereich des Kontaktes zwischen Zelle und Cantilever bildet sich aufgrund dieser Affinität eine negative mechanische Spannung auf den Cantilever, vermittelt durch die Membran, aus. Die infolge der angelagerten Spannungsrampen induzierte mechanische Spannungsänderung der Membran kann aufgrund der großen Gegenkraft des Zytoskeletts auf den Cantilever keine große Wirkung erzielen. Die beobachteten Werte von ca. -50 pN/V bedeuten bei der Rampenbreite von ca. 100 mV und einer Kraftkonstanten des Cantilevers von ca. 15 pN/nm eine Bewegung des Cantilevers von unter einem Nanometer.

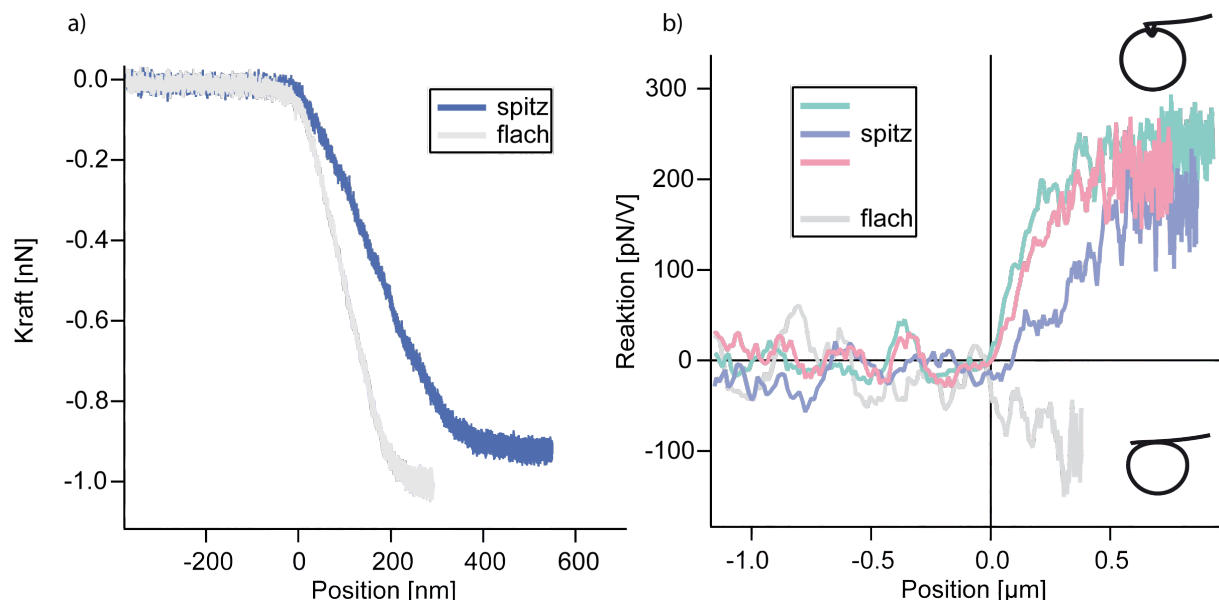


Abbildung 42 – Reaktionsentwicklung bei Kontaktierung einer HEK-Prestinzelle mit spitzem und flachem Cantilever. Der flache Cantilever weist durch den höheren mechanischen Widerstand, bedingt durch die unterschiedliche Kontaktmechanik bei der Andrückung, eine steilere Kraft-Positionabhängigkeit auf als der flache Kraftsensor (a). Die Reaktionsentwicklung (b) ist dabei genau entgegengesetzt. Die eingedrückten Spitzen werden bei Depolarisation von der Zelle weggedrückt und zeigen somit eine der Definition nach positive Reaktion, während der im flachen Kontakt stehende Cantilever zur Zelle hingezogen wird. Die Reaktionsamplituden der eingedrückten Cantileverspitzen sind dabei im Allgemeinen größer.

Reaktionsentwicklungen während des Eindrückvorgangs

Mussten für die in Abbildung 29 und Abbildung 30 gezeigten Zusammenhänge zwischen der Reaktion des Cantilevers und den Eindrückparametern noch mehrere Experimente mit einer Variation der entsprechenden Parameter durchgeführt werden, können diese Zusammenhänge nun für jeden einzelnen Eindrückvorgang individuell untersucht werden. Um eine Zeit- bzw. Zellzustandsabhängigkeit der gemessenen Entwicklungscharakteristiken zu untersuchen, wurden einzelne Zellen mehrfach nacheinander kontaktiert. Die Positionsabhängigkeit wurde durch Variation des Eindrückortes (verschieben des Cantilevers um ca. 100 nm bis 1-2 μm) getestet. Im Folgenden werden drei Zellgruppen separat untersucht und untereinander verglichen. Zum einen die Gruppe der HEK-WT-Zellen und zum anderen stark und schwach reagierende Prestinzellen. Als Grenzwert bietet sich der oben ermittelte Wert von 0,6 nN/V an.

HEK-WT-Zellen zeigten ähnlich variable Reaktionsabhängigkeiten wie HEK-Prestinzellen, deren Reaktionswerte unter 0,6 nN/V lagen. Insgesamt konnten zwei verschiedene Typen von Reaktionsentwicklungen beobachtet werden: lineare Zusammenhänge zwischen Reaktion und Eindrücktiefe sowie Eindrückkraft auf der einen Seite und eine Abflachung des Anstieg der Reaktion mit zunehmender Tiefe und Kraft auf der anderen Seite. Im zweiten Fall konnten die Daten mehr oder weniger durch eine Kombination aus einem linearen und wurzelförmigen Verhalten beschrieben werden. Entsprechende Fits sind in den folgenden Graphiken implementiert. Eine direkte Zeitabhängigkeit der auftretenden Entwicklungsmuster konnte nicht beobachtet werden, vielmehr zeigte sich eine Abhängigkeit von der Eindrückposition. Eine representative Zusammenfassung gefundener Zusammenhänge findet sich in Abbildung 43 für HEK-Prestin- und in Abbildung 44 für HEK-WT-Zellen.

Die in Abbildung 43 gezeigten vier Reaktionsentwicklungen wurden an vier verschiedenen Positionen zeitlich kurz hintereinander aufgenommen. Mit der Variation des Ortes wechselte auch der Charakter der Entwicklungsplots. Das zeitlich abwechselnde Auftreten zeigt, dass die Art der Reaktionsentwicklung nicht primär von der Zeit abhängt. Ein Zusammenhang der Beobachtungen mit Differenzen im Positions-Zeitverlauf des Eindrückvorgangs des Kraftsensors scheint unwahrscheinlich, da die unterschiedlichen Entwicklungen sich bereits einstellen, bevor sich die Geschwindigkeiten (Steigung in Abbildung 43 (b)) der Cantilever merklich unterscheiden. Vor dem Punkt der beginnenden Geschwindigkeitsdifferenzen zeigen sich allerdings mehr oder weniger ausgeprägte Unterschiede in den Kraft-Abstands-Kurven (Steigung, Charakter). Diese können nicht mit den Variationen der gezeigten Reaktionscharakteristiken verknüpft werden bzw. ein solcher systematischer Zusammenhang ist nicht offensichtlich. Insgesamt scheint also die Größe der Reaktion und die entsprechenden Zusammenhänge mit den Eindrückparametern eine Abhängigkeit der lokalen Umstände zu besitzen. Interessanterweise weisen die nichtlinearen Entwicklungen fast immer eine höhere Anfangssteigung als das lineare Pendant auf.

Die Verhältnisse, die bei HEK-WT-Zellen untersucht werden können, ähneln den gerade beschriebenen Beobachtungen an HEK-Prestinzelle. Vor allem die Abhängigkeit der Reaktion von der Position auf der Zelle ist hier ebenso evident. Insgesamt zeigen fast alle Eindrückkurven einen linearen Zusammenhang zwischen den Parametern mit einer örtlich variierenden Steigung (vgl. Abbildung 44). Kommt es zu ähnlich wie in Abbildung 43 gezeigten Abweichungen könnte man teilweise einen Zusammenhang mit der

Ausprägung eines viskosen Charakters der Kraft-Abstandskurve vermuten. Dies ist aber nur in seltenen Ausnahmen der Fall.

Die Gemeinsamkeiten der beobachteten Reaktionsentwicklungen von HEK-WT- und HEK-Prestinzellen mit einer geringen Reaktionsgröße von maximal 0,6 nN/V sind eine örtliche Variation der Reaktionsentwicklungen und Eindrückungskurven. Die Zusammenhänge zwischen Kraft und Reaktion sind dabei teilweise linear, Abweichungen von diesem Verhalten weisen eine Verringerung der Reaktionszunahme auf. Fits mit einer Funktion, die aus einem linearen und wurzelförmigen Anteil besteht, repräsentieren die Daten im nichtlinearen Fall teilweise recht ordentlich.

Die im Grundlagenteil beschriebenen Zellmodelle (Hertz, linear viskoelastisch, Tropfen) beinhalten alle einen linearen Zusammenhang zwischen der Eindrücktiefe und dem Kontaktumkreis. Da die Reaktion in den Modellen ebenfalls proportional zum Kontaktumkreis ist, würde man einen linearen Zusammenhang zwischen der Eindrücktiefe und der Reaktion erwarten. Wie Abbildung 43 und Abbildung 44 zeigen, gibt es teilweise Abweichungen von diesem Verhalten. Es handelt sich dabei immer um eine Verringerung der Reaktionszunahme mit zunehmender Eindrücktiefe. Diese Abschwächung könnte von einer Affinität der Membran zum Cantilever herrühren, die auch für die beobachteten negativen Reaktionen in den Versuchen mit den flachen Cantilevern eine plausible Erklärung lieferte. Durch die Affinität ändert sich an der Kontaktlinie zwischen Cantilever und Membran der Winkel, der zum Beispiel im Hertz-Modell nicht vorgesehen ist, in dem sich die Membran tangential vom Cantilever trennt. Durch den zusätzlichen Winkel verringert sich der Anteil der durch die Membran auf den Cantilever übertragenen Kräfte.

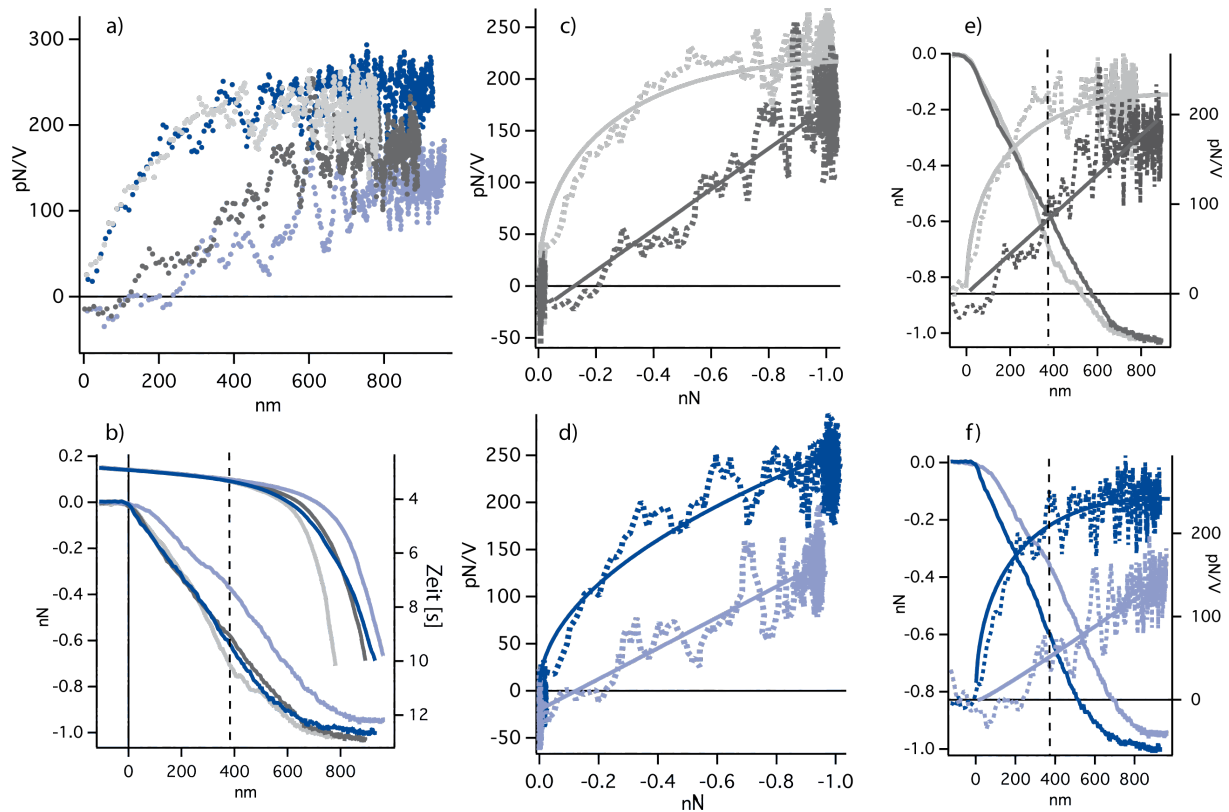


Abbildung 43 – Reaktionsplots für kurz aufeinanderfolgende Eindrückungen an verschiedenen Stellen einer HEK-Prestinzelle. Die vier kurz hintereinander aufgenommenen Reaktion-Positionsplots (a) zeigen paarweise unterschiedliche Reaktionsentwicklungen (zuerst wurden die blauen Kurven aufgenommen dann die grauen, die helleren Kurven jeweils zuerst). In den Kraft-Abstands-Kurven zeigen sich lokale Unterschiede, die sich bereits abzeichnen, bevor die Eindrückgeschwindigkeiten der Cantilever (inverse Steigung der Zeit-Positionskurven in (b)) sich signifikant unterscheiden. Die gestrichelte Linie markiert den Punkt der beginnenden Geschwindigkeitsdifferenzen in (b,e,f). Die Reaktions-Kraft-Plots (c,d) weisen ähnliche Differenzen (linear, wurzelförmig) auf wie die Reaktions-Positions-Kurven (a). Während sich die Reaktionsunterschiede für das graue Experimentepaar bereits etabliert haben, bevor sich die Kraft-Abstands-Plots unterscheiden (e) sind die Differenzen für das blaue Paar von Anfang an in beiden Kurven zu erkennen (f).

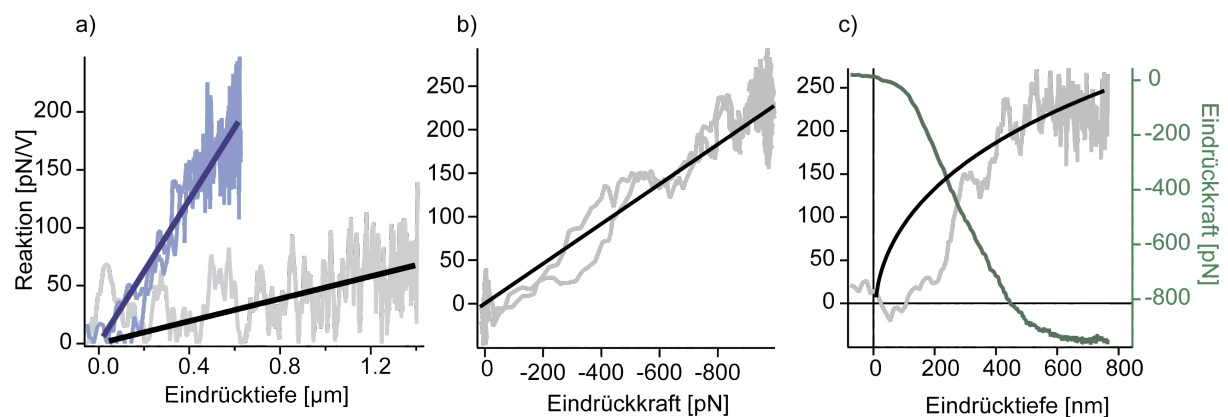


Abbildung 44 – Zusammenhänge zwischen den Eindrückungsparametern sowie der Reaktion von HEK-WT-Zellen. Zwischen Reaktion und Eindrücktiefe (a) sowie Eindrückkraft (b) besteht häufig ein linearer Zusammenhang dessen Steigung bei einzelnen Zellen mit der Eindrückposition variieren kann. Eine Abweichung vom linearen Verhalten (c) kann teilweise parallel zu einer Verstärkung des viskosen Charakters der Kraft-Positionskurve beobachtet werden.

In den Kraft-Reaktionskurven sind lineare wie auch wurzelförmige Zusammenhänge zu finden. Vernachlässigt man das viskose Verhalten während der Eindrückung kann man hier das lineare Verhalten mit Hilfe des Tropfenmodells und das wurzelförmige mit Hilfe des Hertzmodells erklären. Voraussetzung ist auch wieder ein linearer Zusammenhang zwischen Kontaktumkreis und Reaktion. Das Tropfenmodell basiert auf einer Gegenkraft, aufgebracht durch die Membranspannung während das Hertzmodell sich auf die Elastizität der Zelle insgesamt bezieht. Lineares Verhalten in den Kraft-Reaktionskurven könnte man also gut mit einer dominanten Rolle der Membran bei der Aufbringung der Gegenkraft erklären. Sobald es zu Abweichungen kommt, spielt das Zytoskelett bzw. das Zytosol eine zunehmende Rolle. Die beobachtete räumliche Inhomogenität könnte daher auf eine unterschiedlich starke Beteiligung der Membran und des Zytoskeletts zurückgeführt werden.

Stark reagierende Prestinzellen

Die Beobachtungen an stark reagierenden HEK-Prestinzellen mit 0,6 nN/V zeigen insgesamt ein anderes Bild, wie in den Graphen der Abbildung 45 zu sehen ist. Bei den hier dargestellten Zellen handelt es sich um die in Abbildung 41 hervorgehobenen Beispiele. Auffällig ist zuerst einmal, dass die Kraft-Abstands-Kurven keinen offensichtlich viskosen Charakter aufweisen. Ohne merkliche Steigungsänderungen (abgesehen von der erstkontaktnahen Zone) wird die eingestellte Kraft erreicht und gehalten. Teilweise ändert sich die Position, sprich die Eindrücktiefe, anschließend, allerdings ohne dabei eine Änderung in der Andrückkraft zu verursachen (die Regelung verhindert ja genau eine solche Änderung). Die beiden Zellen haben gemein, dass die Kraft-Abstands-Kurven mit zunehmender Zeit steiler werden wobei dieses Verhalten bei der zweiten dargestellten Zelle wesentlich ausgeprägter ist. Abgesehen von einigen Abweichungen in den Endpunkten der Kurven zeigen alle Abhängigkeiten der Reaktionen von der Eindrücktiefe und Eindrückkraft ein ausgeprägtes lineares Verhalten. Man muss beachten, dass die eingestellten Kräfte bei der ersten dargestellten Zelle variieren wobei sie im zweiten Fall konstant bei 1 nN gehalten wurden. Das bereits in Abbildung 41 gezeigte paradoxe Verhalten der zweiten Zelle in Gestalt der Zunahme der Reaktion trotz geringerer Eindrücktiefe könnte bei der ersten Zelle ebenfalls, wenn auch nicht in einer so ausgeprägten Form beobachtet werden, wenn die Werte wiederholt mit einer konstanten Eindrückkraft ermittelt worden wären. Das etwas kurios erscheinende Verhalten, in Form eines Zurückziehens des Cantilevers nach Erreichen der eingestellten Kraft, der zweiten Zelle (weniger ausgeprägt auch teilweise bei der ersten Zelle zu sehen) liefert Hinweise für eine mögliche Interpretation der beschriebenen Beobachtungen. Die Analyse dieses Verhaltens kann durch das zusätzliche Studium der entsprechenden zeitlichen Entwicklungen erleichtert werden, die für eine der Kurven der Zelle 2 in Abbildung 46 dargestellt sind. Die Regelung während des Eindrückvorgangs sorgt dafür, dass eine bestimmte Kraft erreicht wird die dann eine gewisse Zeit bis zur folgenden Messung bzw. dem Rückzug des Cantilevers gehalten wird. Da eine viskoelastische Zelle meist ein wenig nachgibt während sie im Kontakt mit dem Cantilever steht, muss dieser zur Konstanthaltung der Kraft üblicherweise nachgefahren werden, die Eindrücktiefe steigt. In den gezeigten Kurven ist das Gegenteil der Fall, der Cantilever muss zurückgezogen werden um die Kraft konstant zu halten. Dies bedeutet effektiv, dass sich entweder die MembranstEIFigkeit oder die Steifigkeit des Zytoplasmas erhöht. Dass parallel zum Rückzug des Cantilevers die Reaktion ansteigt, die ja durch die Membran vermittelt wird, spricht für ihre Versteifung. Die Interpretation der Zunahme durch eine Vergrößerung des Kontaktkreises ist aufgrund der Rückzugsbewegung des Cantilevers eher

unwahrscheinlich. Es scheint also, als ob die lokale Membransteifigkeit während der Experimente steigt, einen immer größeren Anteil an der auf den Cantilever aufgebauten Kraft einnimmt und somit eine Vergrößerung der linearen Steigung in den Reaktionsentwicklungsplots bewirkt. Da dieses Verhalten lediglich bei stark reagierenden HEK-Prestinzellen beobachtet werden konnte liegt die Vermutung nahe, dass Prestin an diesem Effekt beteiligt ist.

Insgesamt kann man festhalten, dass die stark reagierenden Zellen in ihren Kraft-Abstands-Kurven ein eher elastisches Verhalten aufweisen, wobei scheinbar die Steifigkeit der Zellen mit dem Fortschreiten der Zeit steigt, was an der „Vergrößerung“ der Steigung in den Kraft-Positionsplots zu erkennen ist. Die Abhängigkeiten der Reaktion von den Eindrückparametern weist ein ausgeprägtes lineares Verhalten während der Phasen des Kraftaufbaus auf. Die beobachteten Effekte des Rückziehens des Cantilevers beim Halten der eingestellten Kraft sprechen für eine permanente Erhöhung der Membransteifigkeit.

Eine abschließende Interpretation wird im Kapitel „Vergleich der Eindrück- und “ vorgenommen.

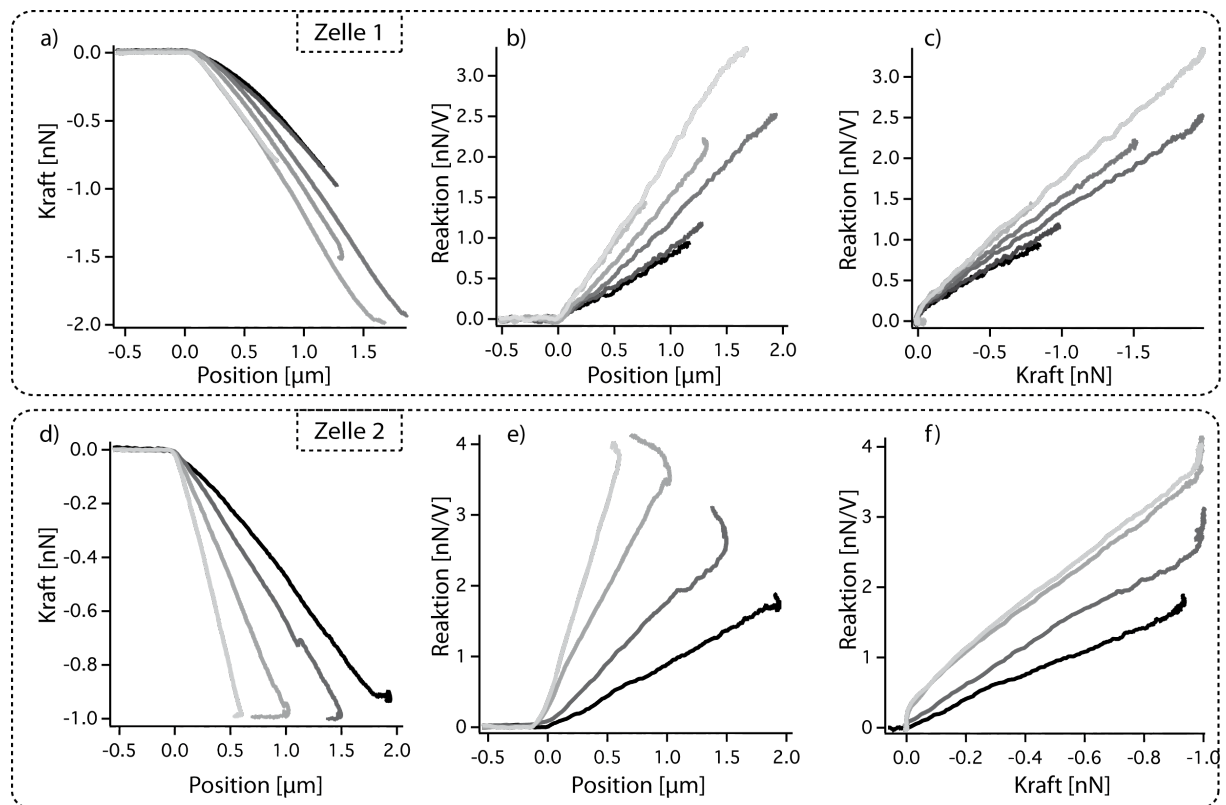


Abbildung 45 – Zusammenhänge Eindrückparametern sowie der Reaktion zweier stark reagierender HEK-Prestinzellen. Die Graustufen der Kurven kodieren die zeitliche Abfolge: Je heller die Kurve desto später wurde sie aufgenommen. Die Kraft-Positionsplots der beiden Zellen (a,d) zeigen ein relativ lineares Verhalten wobei die Steigung der Eindrückkurven mit der Zeit ansteigt. Die erreichte Eindrückkraft variiert bei Zelle 1 während sie bei Zelle 2 konstant gehalten wird. Am Ende einiger Kurven ist ein Zurückziehen des Cantilevers bei gleichbleibender Kraft zu erkennen (vgl. Abbildung 46). Die Reaktions-Positionskurven (b,e) sowie die Reaktions-Kraftplots (c,f) weisen ebenfalls lineare Zusammenhänge auf, wenn man von dem Verhalten nach Erreichen der endgültigen Kraft absieht. Mit zunehmender Zeit „vergrößern“ sich auch hier die Steigungen. Zelle 2 zeigt eine stärkere zeitliche Variation als Zelle 1.

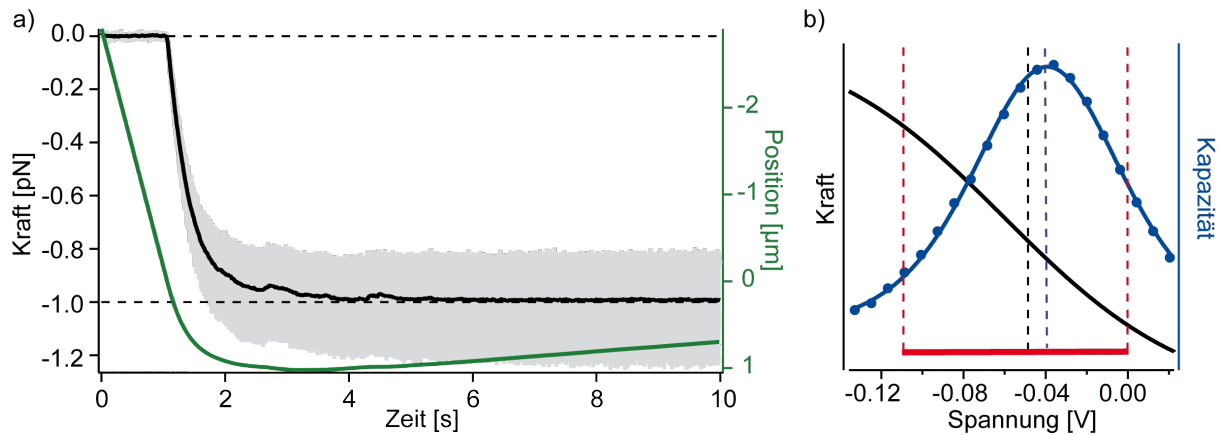


Abbildung 46 – Kraft- und Positions-Zeit-Kurven der in Abbildung 45 gezeigten Zelle 2 sowie dazugehörige NLC- und Elektromotilitäts-Daten. Während der Eindrückung (a) kann man eine Zunahme der Reaktion des Cantilevers auf die parallel angelegten Spannungsrampen (nicht gezeigt) anhand der Verbreiterung der Kraftkurve sehen (grau). Die Position des Cantilevers (grün) wird so geregelt, dass die durchschnittliche Kraft des Cantilevers (schwarz) den voreingestellten Werte erreicht. Anders als üblich wird in bei dieser Zelle der Cantilever nicht nachgefahren (viskose Effekte) sondern zurückgezogen was für eine Versteifung der Komponenten spricht. Der Mittelwert der Kraftdaten liegt nicht im Zentrum der Kraftkurve, was auf die asymmetrische Reaktion des Cantilevers aufgrund der nichtlinearen Kapazität (b) zurückgeführt werden kann. Die Datendichte ist im Bereich des Peaks der NLC aufgrund der dort steileren Kraftentwicklung (schwarz) am geringsten, was zu einer dezentralen Lage des Mittelwertes der im Bereich der Spannungsrampe (rot) aufgenommenen Datenpunkte führt.

Reaktionsentwicklungen während der Rückzugsphase

Die systematische Messung von negativen Reaktionen mit Hilfe des Seal- bzw NLC-Pulses im adhäsiven Kontakt hatte sich aufgrund der im Allgemeinen geringen Reaktionsgröße und der komplizierten Einstellung eines definierten Kontakts als schwierig herausgestellt. Die kontinuierliche Messung der Reaktionsdaten während des Rückzugs ermöglicht eine Erhöhung der Genauigkeit der ermittelten Reaktionswerte durch die Möglichkeit einer statistischen Mittelung. Neben der bei der Eindrückung bereits genauer untersuchten Entwicklung der Reaktionsamplitude kann bei der Entfernung des Cantilevers von der Zelle außerdem eine Umkehr der Reaktionsrichtung festgestellt werden. So war es möglich den Kontaktpunkt bzw. den Punkt eines kraftfreien Cantilevers bereits vor dem endgültigen Lösen von der Zelle in der Rückzugsspur zu identifizieren. Genaugenommen muss der Umkehrpunkt nicht unbedingt die Stelle sein, an dem auf den Cantilever keine Kraft mehr wirkt, vielmehr überträgt die Membran hier keine messbare Reaktion mehr. Grob ist die Identifikation des Punktes, weil aufgrund der kontinuierlich bis hierhin abnehmende Reaktionsamplitude das Signal in diesem Bereich sehr gering ist. In Abbildung 47 ist anhand der Kraft- und Spannungsplots aus charakteristischen Zonen das beschriebene Verhalten dargestellt.

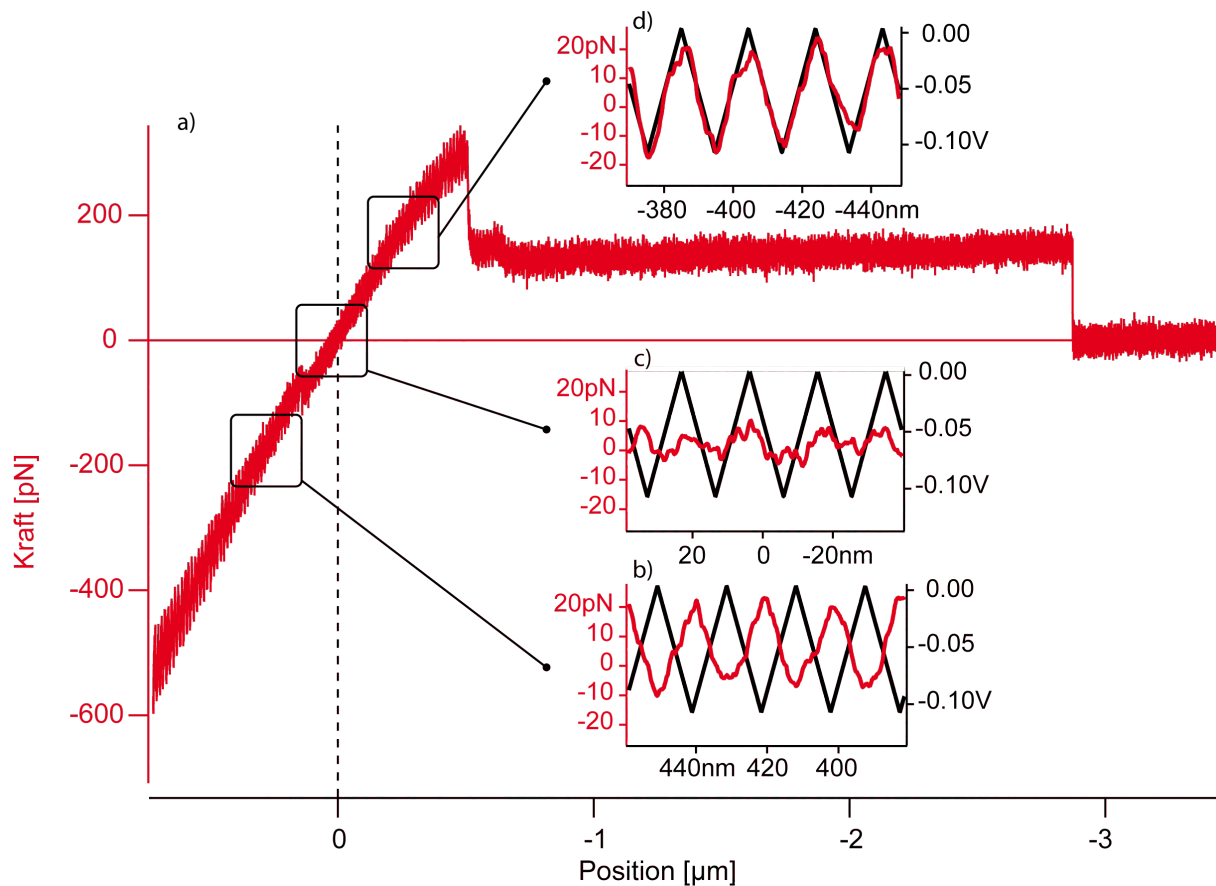


Abbildung 47 – Beobachtung der zueinander inversen Reaktionen des in verschiedenen Rückzugsphasen unterschiedlich mechanisch vorgespannten Cantilevers. Die Technik der konstanten Bestimmung der Reaktion der Membran ermöglicht es während des Rückzugs des Cantilevers den Übergang von der Eindrückung zur adhäsiven Phase anhand des Reaktionsverhaltens zu beobachten. Die mit Verminderung der Eindrückkraft kleiner werdende periodische Kraftentwicklung des Cantilevers (b) geht nach einem kräftefreien Moment (c) in die inverse Adhäsionsphase (d) über. Die nun im Vergleich zu (b) entgegengesetzte Reaktion steigt wieder parallel zur Adhäsionskraft.

Aufgrund der erhöhten Präzision kann nun auch eine systematische quantitative Untersuchung der negativen Reaktionswerte vorgenommen werden. Die Entwicklung der Kraft und der Reaktion verläuft in den meisten Kurven relativ synchron. Für eine quantitative Analyse bieten sich vor allem solche Bereiche der Rückzugkurve an, in denen die Kraft trotz Zunahme der Entfernung konstant bleibt. In diesen Zonen steht der Cantilever nur noch durch Membrantether mit der Zelle in Verbindung und man kann für die Ermittlung der Reaktionsgröße über viele Werte mitteln (die Genauigkeit des so gemessenen Werts steigt mit der Anzahl der zur Verfügung stehenden Messpunkte). In Abbildung 48 sind Kraft-Abstandskurven und die entsprechenden Reaktionsplots für Rückzugskurven, in denen die Adhäsion teilweise durch Tetherbindungen vermittelt wurde, dargestellt.

Anhand der Kraft-Abstandskurve wurden Bereiche konstanter Kraft identifiziert und die entsprechenden Reaktionswerte gemittelt. Dies wurde für alle erkennbaren, durch Stufen getrennten, Bereiche vorgenommen die eine gewisse Länge überspannten, damit genügend Reaktionswerte zum Mitteln zur Verfügung standen. Die Kräfte und dazugehörigen Reaktionswerte einzelner Tether erhält man durch Differenzbildung der Werte aus benachbarten Bereichen. Man kann auch die Differenz zu den Werten des freien Cantilevers bilden, dann erhält man aber nur eine Gesamtkraft der Verbindung

und die Werte der später reißenden Tether werden mehrfach in die Auswertung einfließen. Man kann in fast allen gemessenen Rückzugskurven negative Reaktionen beobachten, ausreichend ausgedehnte Tether sind etwas seltener. Insgesamt wurden 21 Werte an HEK-WT- und 89 an HEK-Prestinzellen ermittelt. Sie sind zusammenfassend in Abbildung 49 dargestellt.

Die Reaktionswerte der Prestinzellen waren im Mittel größer als die der HEK-WT-Zellen. Die auftretenden Bindungskräfte lagen in einem Bereich von 0 bis 200 pN mit wenigen Ausreißern bis 300 pN. Die Verteilung der Kräfte ist für beide Zellsorten nicht auffallend unterschiedlich. Maximal gemessene Werte sind ca. -40 pN/V und -120 pN/V. Die Histogramme zeigen Bereiche in denen sowohl WT als auch Prestinzellen vorkommen, ca. 30% aller Prestinwerte liegen über dem Werte von -40 pN/V. Lineare Fits weisen eine Steigung von 0,24 1/V sowie 0,13 1/V mit Korrelationskoeffizienten von 0,40 und 0,67 auf (Prestin, HEK).

Insgesamt zeigt sich ein ähnliches Bild wie für die Eindrückexperimente: Relativ breit gestreute Werte, wobei die Reaktion der Prestinzellen im Mittel stärker ist. Eine ähnlich ausgeprägte Lücke zwischen starken und schwachen Reaktionen, die es in den Histogrammen bei ca. 1 nN Eindrückkraft gibt, lässt sich nur erahnen. Die Anzahl der Datenpunkte ist für eine genaue Aussage aber zu gering.

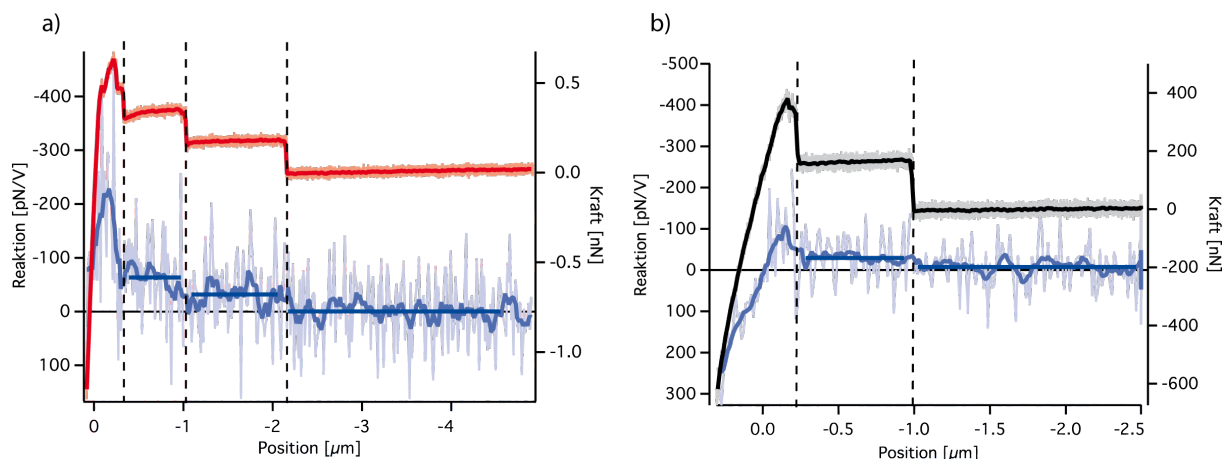


Abbildung 48 Reaktionsentwicklung während der Rückzugphase des Cantilevers. In der Adhäsionsphase zeigt sich ein zur Kraftkurve paralleler Verlauf der Reaktionen in HEK-Prestin- (a) und HEK-WT- (b) Zellen. Parallel zu Abrissen von adhäsiven Verbindungen, gekennzeichnet durch Stufen in der Kraftkurve, kann ein Abfallen in der Reaktionsspur beobachtet werden. Die Mittelung der Werte in den entsprechenden Abschnitten bestätigt den optischen Eindruck. Die Amplituden der HEK-Prestinzelle fallen dabei höher aus als bei der HEK-WT-Zelle. Die entsprechenden Stufenwerte (mit den mittleren Fehlern und Standardabweichungen in Klammern) in den markierten Bereichen sind in pN/V: (a) -64, -32, -1 (2, 19; 3, 20; 2, 14); (b) -30, -7 (2, 9; 2, 19).

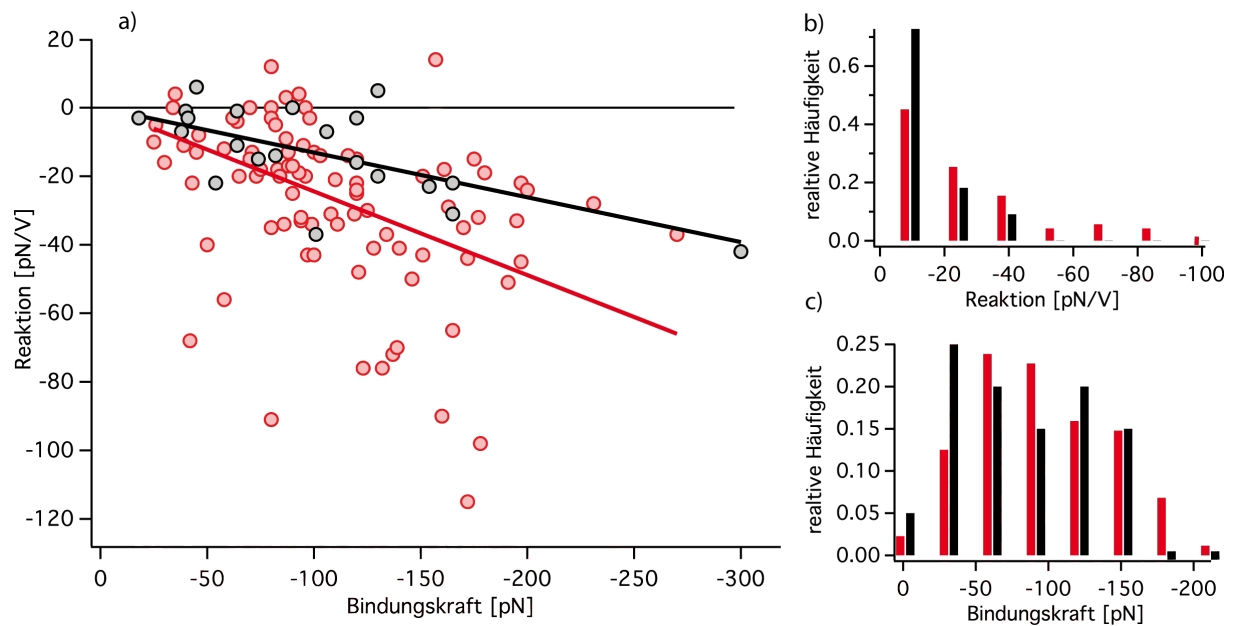


Abbildung 49 – Zusammenfassung aller gemessenen negativen Reaktionen aufgetragen gegen die Bindungskraft. Die Reaktions-Kraft-Plots (a) zeigen eine breite Streuung der Daten beider Zellsorten. Ein linearer Fit der HEK und Prestin Datenpunkte liefert eine Steigung von $0,13 \text{ 1/V}$ (Korrelationskoeffizient $0,67$) und $0,24 \text{ 1/V}$ (Korrelationskoeffizient $0,40$). Die Histogramme der Reaktion (b) zeigen eine Koexistenz von Werten beider Zellen bis ca. -40 pN/V . Die Histogramme der Bindungskraft (c) weisen keine offensichtlichen Unterschiede auf.

4.2.3 Vergleich der Eindrück- und Rückzugsexperimente

Sowohl die Experimente mit negativ als auch positiv mechanisch vorgespanntem Cantilever zeigten eine breite Streuung der gemessenen Reaktionen. Die Datenpunkte beider Experimententypen (Tetherexperimente aus Abbildung 49 und Eindrückungsexperimente aus Abbildung 32) sind noch einmal in Abbildung 50 zusammenfassend dargestellt. Die Eindrückdaten sind dabei auf den Bereich unter $1,2 \text{ nN}$ (Eindrückkraft) und $1,6 \text{ nN/V}$ (Reaktion) beschränkt. Dies ist sinnvoll, da hier die größte Datendichte vorliegt. Um beide Datensätze zu vergleichen, muss man die Auftragung gegen die jeweilige Kraft wählen, da bei den Tetherexperimenten die gezogene Länge (bei konstanter Kraft) stetig wächst und somit keine sinnvolle Größe darstellt. Fits von Ursprungsgeraden an die Daten zeigen im Bereich der negativen Kräfte kleinere Steigungswerte ($0,13 \text{ 1/V WT}$ und $0,24 \text{ 1/V Prestin}$) als im Bereich der Eindrückungen ($0,30 \text{ 1/V WT}$ und $0,74 \text{ 1/V Prestin}$). Die Mittelwerte der Daten sind in Tabelle 4 zu finden. Für die Eindrückungsexperimente sind dabei Subpopulationen im Bereich zwischen $0,8 \text{ nN}$ und $1,2 \text{ nN}$ ausgewertet worden. Die Prestindaten sind zusätzlich noch einmal in einen stark und einen schwach reagierenden Teil gesplittet.

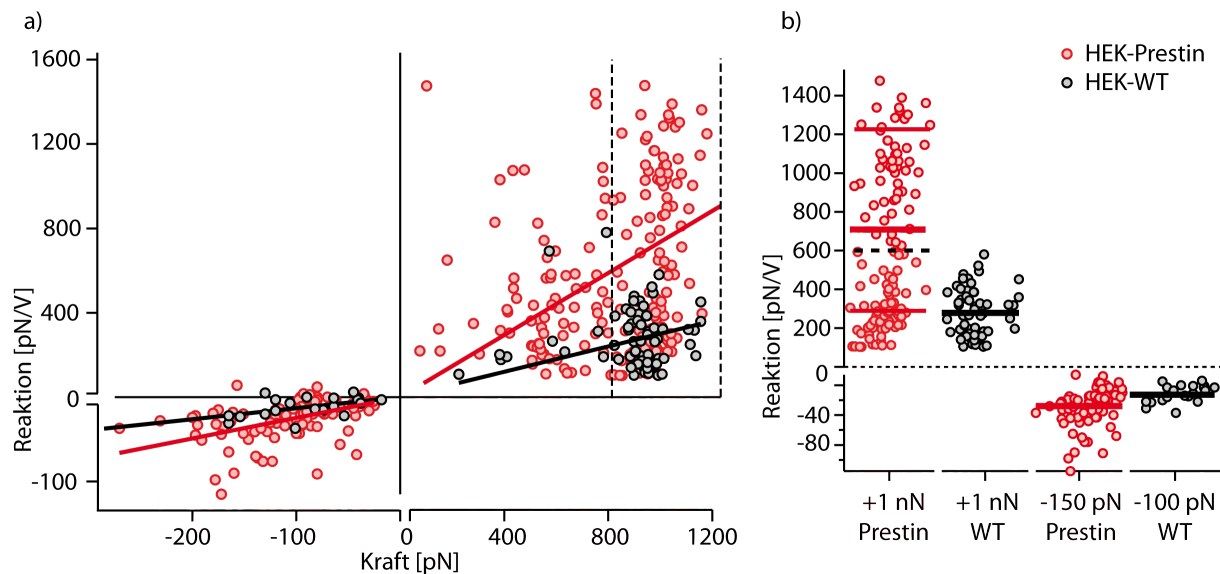


Abbildung 50 – Zusammenfassung der Reaktionswerte bei Eindrück- und Adhäsionsmessungen. Die Reaktions-Kraft-Darstellung (a) ist für den positiven Bereich (+) vierfach „gezoomt“, damit ein besserer Vergleich möglich ist. Auffällig sind die unterschiedlichen Steigungen der Regressionsgeraden für negative und positive Werte: (-) 0,13 WT; 0,24 Prestin; (+) 0,30 WT und 0,74 Prestin (jeweils 1/V). Die Populationen zwischen 0,8 pN und 1,2 pN für die Eindrückung sowie für die negativen Datenensembles sind in (b) mit ihren jeweiligen Mittelwerten dargestellt (vgl. Tabelle 4). Die Prestindaten der Eindrückung sind noch einmal in zwei Subpopulationen mit Reaktionen über und unter 0,6 nN/V eingeteilt (gestrichelte Trennlinie).

Kraftbereich	WT [pN/V] (alle)	Prestin [pN/V] (alle)	Prestin [pN/V] (< 600 pN/V)	Prestin [pN/V] (> 600 pN/V)
negativ (-)	-13±14	-28±25	-	-
positiv (+)	260±120	700±690	290±130	1230±800

Tabelle 4 Zusammenfassung der Reaktions-Mittelwerte und ihrer Standardabweichungen der in Abbildung 50 (b) gezeigten Daten. Im negativen Kraftbereich war die mittlere Kraft nach Abzug des viskosen Anteils (71±35) pN (vor Abzug (108±53) pN). Werte für den positiven Bereich sind für die Kräfte zwischen 0,8 nN und 1,2 nN ermittelt (Mittelwert und Standardabweichung sind (970±75) pN).

Der Grund der unterschiedlichen Steigungen der negativen und positiven Reaktionen ist in der unterschiedlichen Geometrie der Reaktionsentwicklung zu suchen. Bei den eindrückenden Cantilevern wird ein unbekannter Teil der Gegenkraft vom Zytoskelett und nicht von der Membran ausgeübt, was die Reaktions-Kraftabhängigkeit abflacht. In den Tetherexperimenten ist bei der verwendeten Rückzugsgeschwindigkeit von (1,5 µm/s) ein Anteil von ca. 33% der gemessenen Kraft durch die effektive Viskosität η_{eff} der Membran (ca. 1,1 pNs/µm) bedingt, die einen zuggeschwindigkeitsabhängigen Beitrag liefert [72]. Sie kommt unter anderem aufgrund der Interaktion von Zytoskelett und Membran zustande. Beide beschriebenen Kraftkomponenten, die nicht von der Membran alleine stammen, reduzieren die Steigungen der Reaktions-Kraftplots. Zusätzlich ist die Interaktionsgeometrie nicht vergleichbar: Einmal eine Membranfläche und einmal ein Membranring.

Bei den Eindrückungsexperimenten ist der Mittelwert der Prestinwerte (2,69±0,34)-mal höher als der der WT-Zellen, im negativen Bereich ist dieser Faktor 2,15±0,47 (die Fehler errechnen sich mit den Fehlern der Mittelwerte aus Tabelle 4, die im negativen Bereich jeweils 3 pN/V und im positiven Bereich 14 pN/V (HEK) und 80 pN/V (Prestin)

betragen). Der Unterschied der beiden Faktoren ist zwar nicht signifikant, könnte aber auf eine höhere Anzahl oder andere Struktur von involvierten Prestinmolekülen in den Eindrückexperimenten hinweisen. Eine sehr spekulative Interpretation wäre, dass Prestin in Membrantethern keine größeren Prestincluster (vgl. Abbildung 3) mehr bilden kann.

Von Zhang et al. wurden ebenfalls Experimente mit einem eindrückenden Cantilever an HEK-WT-Zellen durchgeführt [43]. Sie lieferten Kräfte im Bereich von ca. 100 pN/V bei einer Eindrückkraft von 460 pN. Dieser Wert ist konsistent mit den hier ermittelten Daten. Mit der Steigung von 0,30 1/V für HEK-WT Zellen erhält man bei 460 pN einen Reaktionswert von 138 pN/V der aufgrund eines geringeren Öffnungswinkels der verwendeten Cantileverspitze (23° (siehe folgendes Kapitel) im Vergleich zu 35° [43]) nach unten korrigiert werden muss. Der korrigierte Wert liegt bei 120 pN/V und ist damit vergleichbar mit den 100 pN/V von Zhang et al.

Tetherexperimente an HEK-Prestin- wie auch HEK-WT-Zellen wurden von anderen Gruppen an kombinierten Optical-Tweezers-Patch-Clamp-Systemen vorgenommen. Bei Kräften von ca. 50 pN wurden Reaktionen von 30 pN/V an HEK-Prestinzellen vermessen [73]. In einem anderen Experiment wurden für Kräfte zwischen 20 pN und 30 pN Reaktionen von 20 pN/V (HEK-Prestin) und 10 pN/V (HEK-WT) ermittelt [72]. Die im Rahmen dieser Arbeit gemessenen Reaktionswerte von 13 pN/V bzw. 28 pN/V wurden bei ungefähr doppelt so großen Kräften (71 pN) bestimmt, liegen aber in der gleichen Größenordnung. Es ist also möglich, mit der hier genutzten Experimentiertechnik, sehr kleine Reaktionen zu vermessen, die sonst nur mit deutlich empfindlicheren Methoden aufgelöst werden konnten. Die gemessenen Reaktionswerte sind konsistent mit den in Optical-Tweezers-Experimenten publizierten Daten.

4.2.4 Verwendete Cantileverspitzen

Um zu überprüfen, inwiefern Unregelmäßigkeiten der verwendeten Cantileverspitzen (MLCT, Bruker) bei der Interpretation der einzelnen Ergebnisse eine Rolle spielen könnten, wurden einige der verwendeten Cantilever mit Hilfe eines Rasterelektronenmikroskops untersucht. Es stellte sich heraus, dass abhängig vom Produktionsdatum der Cantilever teilweise gehäuft Abweichungen von der pyramidalen Spitzenform (mit rautenförmiger Grundfläche) beobachtet werden konnten (vgl. Abbildung 51). Zwei der vier Kanten treffen sich hier bereits vor der Spitze, die von dort ab von einer dreiseitigen, unregelmäßigen Pyramide abgeschlossen wird. Hier ist der durchschnittliche Winkel der Kanten zum Lot geringer als für den vierkantigen Teil. Es wurden neun bzw. sieben Cantilever mit zwei unterschiedlichen Produktionsdaten untersucht. Vier der neun Spitzen, die in den Versuchen mit dem ersten Experimentsetup (Bestimmung der Reaktion nach Eindrückung) verwendet wurden, zeigten die beschriebenen Abweichungen (Produktionszeitpunkt 04/09). Nur für eine der sieben Spitzen, die für die Versuche mit dem zweiten Experimentsetup (kontinuierliche Reaktionsmessung) genutzt wurden, war dies der Fall. Der ermittelte effektive halbe Öffnungswinkel α war 23° (vgl. Abbildung 6).

Eine Korrelation der ermittelten Abweichungen der Cantileverform mit den jeweils bei aufgenommenen Eindrückungs- und Reaktionsplots beobachteten Charakteristiken konnte nicht gefunden werden. Die Asymmetrie der Spitzengeometrie spielt bei den Interpretationen der weiter oben beschriebenen Ergebnisse also keine wesentliche Rolle.

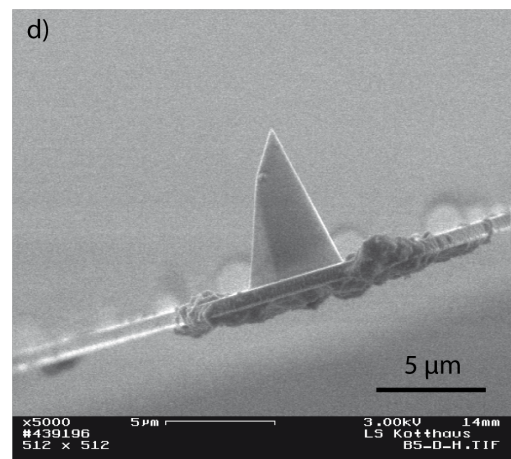
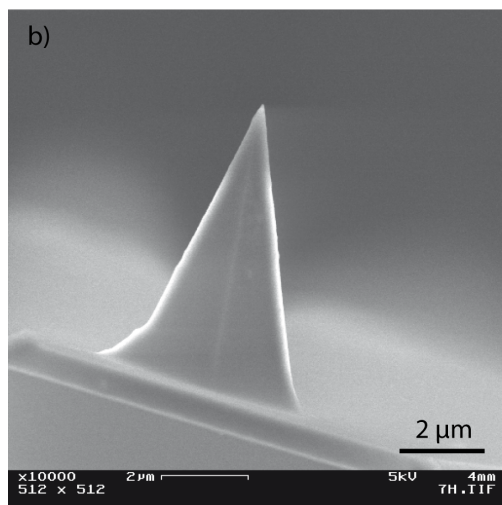
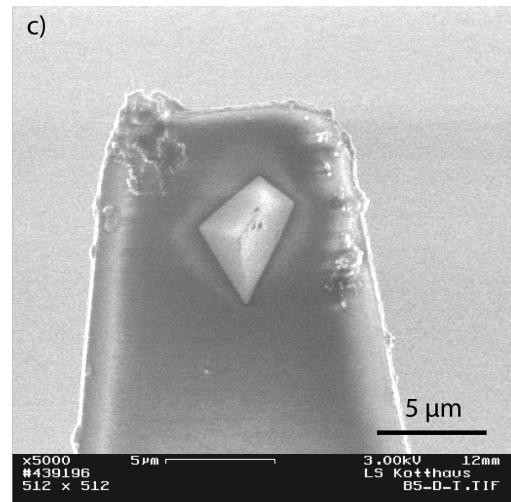
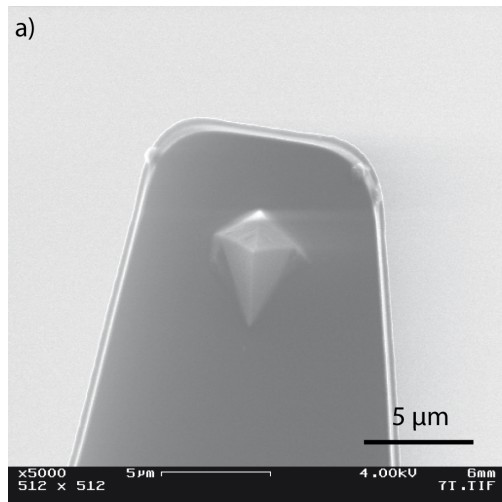


Abbildung 51 – Elektronenmikroskopische Aufnahmen verwendeter Cantileverspitzen. Die Aufsicht (a,c) und die seitliche Ansicht (b,d) zweier Spitzen zeigt das Beispiel einer symmetrischen Geometrie (a,b) und einer von der vierseitigen Pyramide mit rautenförmiger Grundfläche abweichende Form (c,d). Beide Cantilever weisen unterschiedlich starke Verunreinigungen durch die vorangegangene Benutzung auf.

4.3 Öffnen von Ionenkanälen mit Agonisten am Cantilever

4.3.1 Versuche mit P2X7-Ionenkanälen

Ziel der folgenden Experimente war, einen mit Agonisten des P2X7-Kanals funktionalisierten Cantilever zu nutzen, um mechanisch kontrolliert Öffnungs- und Schließevents der in HEK-Zellen exprimierten P2X7-Kanäle zu beobachten. In Vorversuchen wurde die Funktionsfähigkeit der zur Verfügung stehenden P2X7-HEK-Zelllinie getestet. Da ein stabiler Abdichtwiderstand in planaren Patch-Clamp-Experimenten unter andern durch die Verwendung eines sogenannten "Sealenhancer"-Lösung unterstützt wird, musste die Auswirkung der erhöhten Magnesium und Kalziumkonzentration dieser Lösung auf die Ligandeneffektivität untersucht werden. Da ATP und BzATP (2',3'-(Benzoyl-4-benzoyl)-ATP) als Hauptagonist nicht mit gängigen Methoden an die Cantilever gebunden werden können, musste ein ATP Derivat gefunden werden, welches entsprechende Bindungsmöglichkeiten bietet und trotzdem noch funktional ist. Die Größe der zu erwartenden Kanalströme wurde mit den bestimmten elektrischen und geometrischen Parametern der Komponenten und der Messtechnik abgeschätzt um die finalen Experimente zielgerichtet zu analysieren.

Da Kanalöffnungen und -schließungen mit einer signifikanten Änderung des Membranwiderstandes einhergehen wird die Stromantwort auf eine Spannungsrampe während des Einspülens und Ausspülens der Liganden beobachtet. Die verwendete Spannungsrampe überspannt den Bereich von -100 mV bis 100 mV, hat eine Dauer von ca. 200 ms und ist in Abbildung 54 dargestellt. Diese Rampe wird alle zwei Sekunden appliziert und die durchschnittlichen Stromwerte zwischen -100 mV und -90 mV sowie zwischen 90 mV und 100 mV gegen die Zeit geplottet. Ein Öffnen oder Schließen der Kanäle kann dann in der so ermittelten Strom-Zeitspur beobachtet werden. Die symmetrische Analyse der Stromantwort ermöglicht es den Beitrag von endogenen, spannungsgesteuerten Ionenkanälen durch asymmetrische Stromantworten zu identifizieren. Die untersuchten HEK-P2X7 Zellen zeigten mit zunehmender Experimentdauer einen zunehmenden Strom im positiven Spannungsbereich (vgl. Abbildung 52), was auf die allmähliche Aktivierung bzw Integration von endogenen Kanälen deutet. Die Analyse der Kanalströme wurde deswegen unter Verwendung der negativen Stromspur vorgenommen.

Die durch das Ein- und Ausspülen der Agonisten hervorgerufenen Stromantworten variieren in ihrer Amplitude und der Ausprägung der Charaktereigenschaften von Zelle zu Zelle, was unter anderem an den unterschiedlichen Expressiongraden und Zellgrößen liegt. Die Aktivierungsphase kann gut durch die Kombination eines linearen und exponentiellen Anstiegs beschrieben werden, die Deaktivierung verhält sich annähernd biexponentiell wie man an zwei Beispielkurven in Abbildung 53 sehen kann. Die Parameter der beiden Phasen sind laut Literatur stark abhängig von der Ligandenkonzentration. Neben den Unterschieden in den Zelleigenschaften spielt deswegen auch sicherlich die variable lokale Zeitentwicklung der Konzentration eine Rolle bei der Ausprägung der Stromantworten. Die Applikation der Agonisten erfolgte durch Zugabe einer Menge von ca. 1-10 µl der Ligandenlösungen zu einer bereits vorhandenen Lösungsmenge von jeweils ca. 10 µl. Das Mischen der beiden Lösungen kann nur durch leichtes Auf- und Abpipettieren erfolgen damit der Abdichtwiderstand

der Zelle nicht beeinträchtigt wird. Auch wenn diese Methode nach einem festen Protokoll vonstatten ging ist die lokale Entwicklung der Konzentration sicherlich nicht reproduzierbar. Die Bestimmung von beispielsweise EC_{50} -Werten (mittlere effektive Konzentration) gestaltete sich aus den beschriebenen Gründen schwierig. Andere limitierende Faktoren waren die Konzentration von 10 mM sowie die begrenzte Menge der Stocklösungen der Liganden. Da die Kenntnis des jeweiligen EC_{50} -Wertes aber eine untergeordnete Rolle bei den später durchgeführten Experimenten spielt (Oberflächenkonzentrationen des Liganden am Cantilever sind schwer zu ermitteln und schlecht mit Lösungskonzentrationen zu vergleichen) wurden die Effektivitäten der Agonisten jeweils durch Konzentrationsmessungen im Bereich von 0,5 mM bis 2 mM nur abgeschätzt. Die später verwendeten Agonisten lieferten im Schnitt alle eine Stromantwort im Nanoamperebereich bei finalen Konzentrationen im einstelligen millimolaren Bereich und sollten somit, wie später abgeschätzt wird, als Agonisten für die finalen Cantileverexperimente geeignet sein.

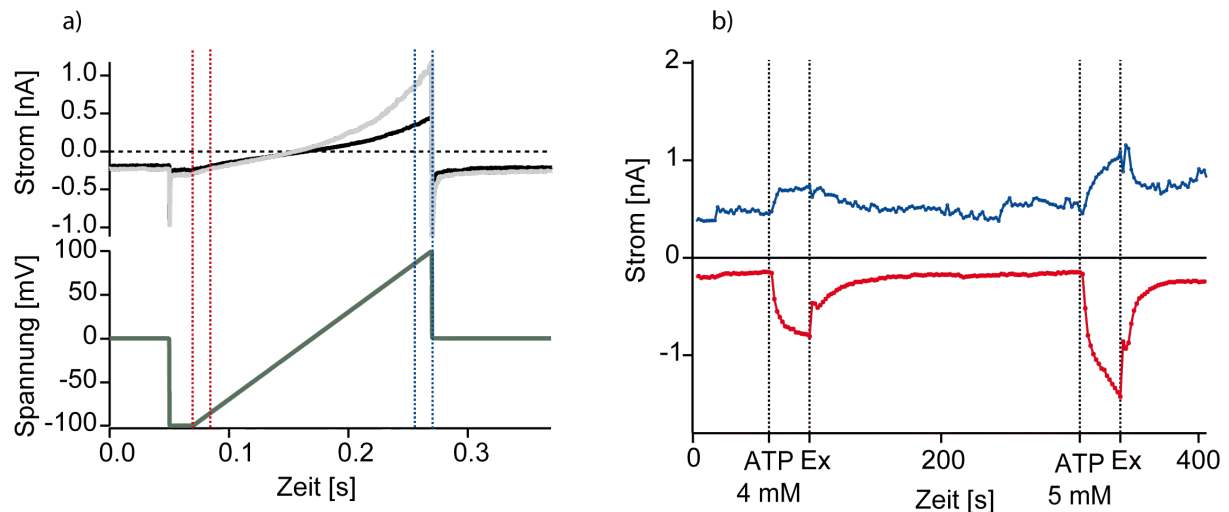


Abbildung 52 – Beobachtung der Entwicklung des Membranwiderstandes. Alle zwei Sekunden wird eine Spannungsrampe (a) von -100 mV bis 100 mV angelegt und die Stromantwort am Anfang (-100 mV bis -90 mV) und am Ende (90 mV bis 100 mV) gemittelt. Die Auftragung dieser Werte gegen die Zeit (b) ermöglicht es, die zu- und abnehmenden Ströme beim Ein- und Ausspülen der Agonisten, beispielsweise ATP, zu beobachten.

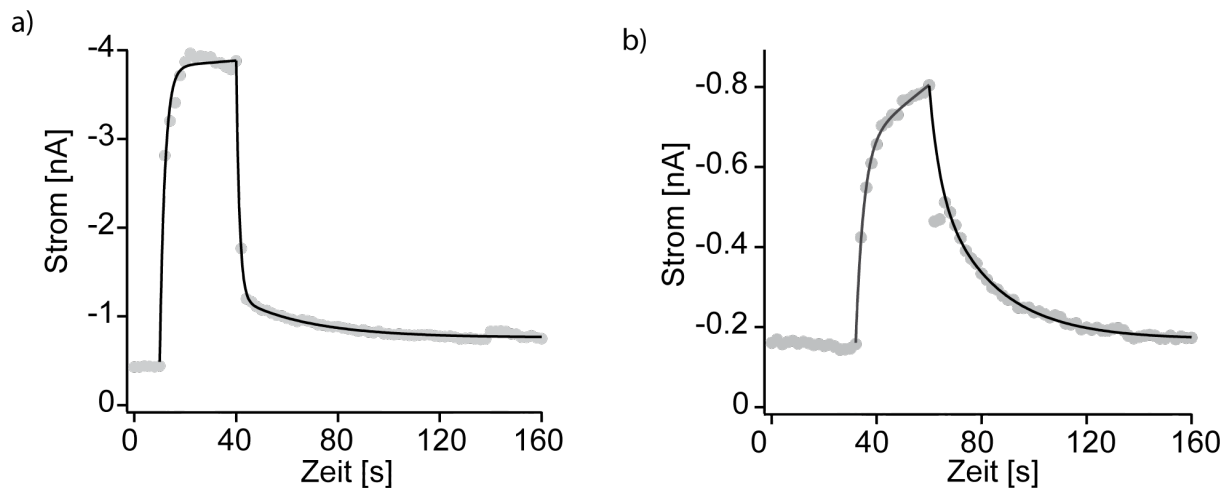


Abbildung 53 – Aktivierungs- und Deaktivierungsmuster von verschiedenen Zellen bei Applikation von ATP. Einspülen von 1 mM (a) bzw. 4 mM (b) ATP und anschließendes Ausspülen bewirken unterschiedliche Stromantworten mit einem linear-exponentiellen Anstieg und biexponentiellen Abfall. Bemerkenswert ist die trotz der geringeren finalen Konzentration in (a) größere Amplitude und der steilere Anstieg ($\tau=2\text{s}$ (a) bzw. $\tau=3\text{s}$ (b)). Die Fitparameter für die Aktivierungsphase ($A_0+A_1 \cdot (1-\exp(-t/\tau)) + m \cdot t$) und Deaktivierungsphase ($A_0+A_1 \cdot \exp(-t/\tau_1) + A_2 \cdot \exp(-t/\tau_2)$) sind in der Reihenfolge τ, m, τ_1, τ_2 : (a) 2,0s; -2,3pA; 28,3s; 1,3s (b) 3,0s; -5,0pA; 22,0s; 3,8s.

Einfluss der Messlösungen

Die Haltbarkeit und die Größe des Abdichtwiderstands der planar gepatchten HEK-293T-Zellen kann mit Hilfe des Sealenhancers erhöht werden. Dieser enthält zu diesem Zweck 35 mM Ca^{2+} sowie 10 mM Mg^{2+} -Ionen was im Gegensatz zu der normal verwendeten externen Patch-Lösung (2 mM Ca^{2+} und 1mM Mg^{2+}) eine 15-fach höhere Konzentration dieser beiden Ionensorten ist. Im Folgenden werden die beiden Lösungen nur noch verkürzt als Sealenhancer und externe Lösung bezeichnet. Aus der Literatur ist bekannt, dass die beiden divalenten Ionen zu einer Verringerung der durch die Liganden hervorgerufenen Effekte führen. Die Vermutung, dass die Verwendung des Sealenhancers zu ähnlichen Auswirkungen führt wurde in entsprechenden Messungen bestätigt (vgl. Abbildung 54). Um eine ähnliche Amplitude der Stromantwort hervorzurufen musste die in Sealenhancer eingespülte finale Konzentration von ATP ca. 100-mal höher sein als unter der Verwendung von externer Lösung. Als Konsequenz mussten die Experimente unter starker Reduktion der Verwendung des Sealenhancers erfolgen. Da dieser aber für die Etablierung eines stabilen Abdichtwiderstands unerlässlich war erfolgte nach Herstellung der Ganzzellkonfiguration das Einspülen von Sealenhancer bis sich ein stabiler Seal ausgebildet hatte. Dann wurde die Konzentration der Ca^{2+} und Mg^{2+} -Ionen durch spülen mit externer Lösung auf insgesamt ca. 3,5 mM reduziert, was ungefähr 20% über der Konzentration der reinen externen Lösung (3 mM) liegt. Als Folge dieses Kompromisses sind sowohl die Effektivität der Agonisten als auch die zeitliche Stabilität des Seals etwas reduziert. Die Auswirkung auf die zeitliche Entwicklung des Stromrauschens kann man in Abbildung 56 sehen.

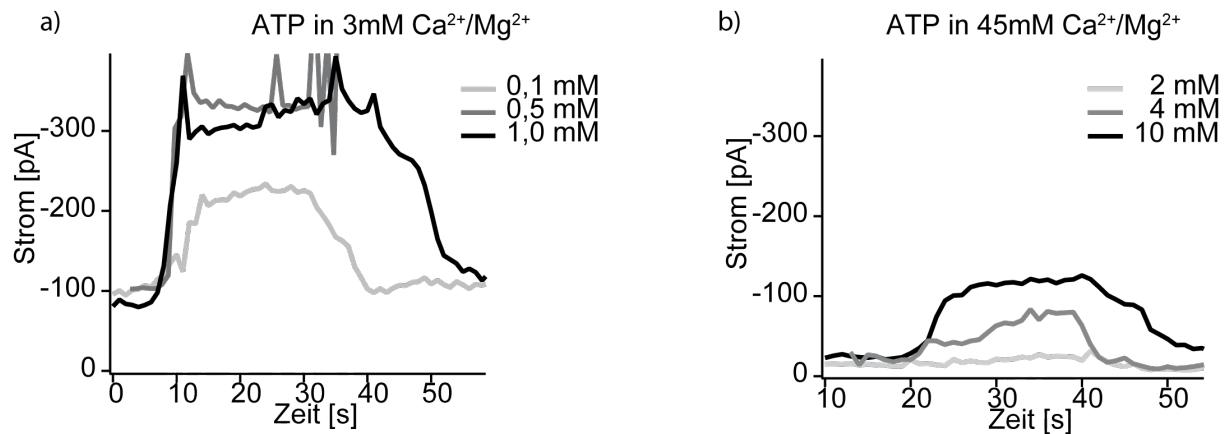


Abbildung 54 – Abhängigkeit der Stromamplituden von der Konzentration der Ca^{2+} und Mg^{2+} -Ionen. Die in der normalen externen Lösung niedrigeren Calcium und Magnesium Konzentrationen (2 mM Ca^{2+} , 1 mM Mg^{2+}) als in der Sealahancer-Lösung (35 mM Ca^{2+} , 10 mM Mg^{2+}) ermöglichen eine höhere Effektivität des applizierten ATPs. Der Abdichtwiderstand ist allerdings in der externen Lösung (a) geringer als im Sealahancer (b), was man an einer niedrigeren Stromstärke bei Abwesenheit des Agonisten erkennen kann. Die Zeitspannen zwischen Ein- und Ausspülen variieren jeweils leicht.

EDA-ATP als Agonist

Als ATP-Derivat, das die Möglichkeit einer Kopplung an den Cantilever bietet, kommt zum Beispiel ein für die Anbindung von Fluorophoren präpariertes ATP in Frage. Die zu diesem Zweck angebrachte funktionelle Gruppe kann man benutzen, um anstatt des Farbstoffs den Cantilever über einen Linker mit dem ATP zu verbinden. Kommerziell erhältliche Varianten besitzen eine über einen kleinen Linker gebundene Aminogruppe, die an verschiedenen Stellen des ATPs sitzen kann. Die getesteten Derivate waren N6-ATP (N^6 -[6-Aminoethyl]-ATP) mit Bindung an den Adeninrest, Gamma-ATP (γ -[6-Aminoethyl]-ATP) mit Bindung über das γ -Phosphat und EDA-ATP ($2'/3'$ -O-(2-Aminoethyl-carbamoyl)-ATP) mit Bindung an der Ribose. Die natürlich vorhandene Aminogruppe des Adeninrests von ATP bietet sich aufgrund der Elektronenkonfiguration des Adeninrests nicht als Bindungsmöglichkeit an.

In verschiedenen Versuchsreihen wurde die Funktionalität der drei Derivate getestet mit einer maximalen finalen Konzentration von 2 mM . Die Funktionsfähigkeit der HEK-P2X7-Zellen wurde jeweils vor oder nach der Applikation des getesteten Kandidaten geprüft. Es stellte sich heraus, dass Gamma-ATP keine Funktionalität besitzt, N6-ATP relativ unzuverlässig kleine Ströme und EDA-ATP reproduzierbar Ströme in der gleichen Größenordnung wie ATP hervorruft. In Abbildung 55 sind Beispiele der induzierten Kanalströme bei sukzessiver Applikation von ATP und EDA-ATP sowie wiederholter EDA-ATP Einspülung mit einer finalen Konzentration von jeweils 1 mM zu sehen. Die Plots zeigen, dass die Stromantwort von EDA-ATP ungefähr halb so groß wie die von ATP ist und auch bei wiederholter Zugabe keine Abschwächung erfährt. Die Stromantworten variierten von Zelle zu Zelle, lagen aber immer im Nanoamperebereich. EDA-ATP ist daher ein funktioneller Agonist des P2X7-Kanals und bietet außerdem die Möglichkeit der Anbindung an den Cantilever.

Versuche, die Funktionalität des EDA-ATPs nach Bindung über einen PEG-Linker (PEG-5000) an ein Substrat zu testen, wurden mit Hilfe von funktionalisierten Beads (Amino-Ademebads, ademtech) unternommen. Die Beads hatten einen durchschnittlichen Radius von 200 nm (maximal 20% Abweichung). Da selbst unfunktionalisierte und nur mit dem PEG-Linker versehene Beads zu Sealbrüchen führten, konnten aus diesen

Experimenten keine Rückschlüsse auf die Funktionalität des via PEG-Linker gebundenen EDA-ATPs gezogen werden. Wir entschlossen uns, die weiteren Funktionalitätstests mit an einen flachen Cantilever gebundenem EDA-ATP fortzuführen. Vorteil gegenüber den Beadexperimenten ist, dass nun eine parallele Kraftmessung möglich ist. Der Nachteil ist eine geringere Kontaktfläche des funktionalisierten Substrats mit der Zelle und infolgedessen eine vermutlich geringere Stromantwort bei erfolgreichem Öffnen von P2X7-Kanälen.

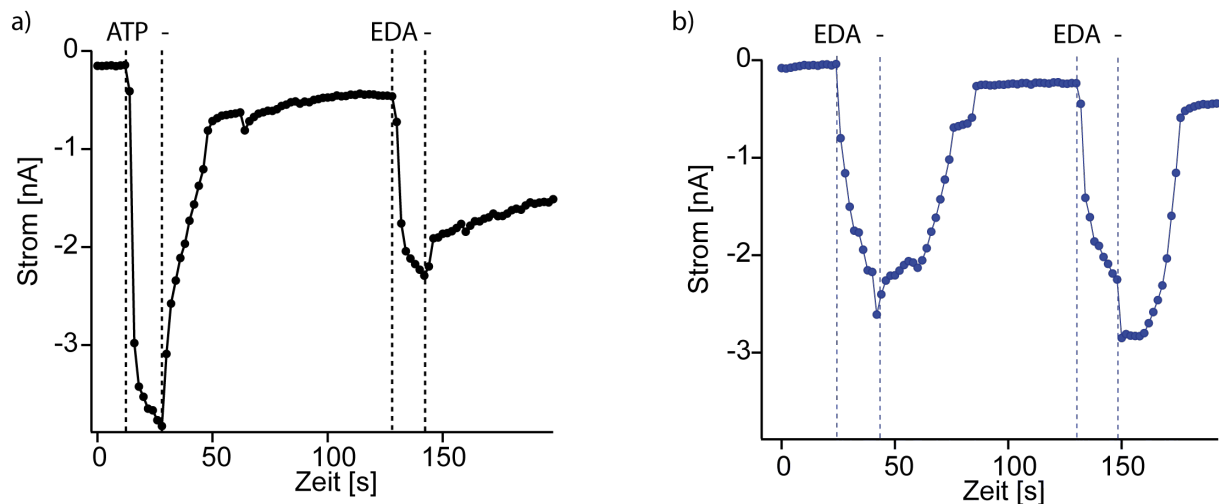


Abbildung 55 – Vergleich der durch EDA-ATP und ATP sowie sukzessive EDA-ATP Applikation hervorgerufenen Stromantworten. Die finalen Konzentrationen nach der Einspülung lagen bei 1 mM, gekennzeichnet ist der jeweilige Zeitpunkt des Ein- und Ausspülens (-). Die Applikation von ATP ruft eine ca. doppelt so große Stromantwort hervor (a). Eine sukzessive Anwendung von EDA-ATP bewirkt eine konstante Stromamplitude.

Abschätzung der maximal möglichen Stromantwort

Die Kenntnis der Amplituden der durch EDA-ATP hervorgerufenen Ganzzellströme ermöglicht es, die bei der Kontaktierung der Zelle mit einem funktionalisierten Cantilever maximal mögliche Stromantwort abzuschätzen. Ein Vergleich mit dem Rauschen der Strommessungen liefert eine Größenordnung des zu erwartenden Signal-Rausch-Verhältnis. Die Folge der Reduktion der Ca^{2+} und Mg^{2+} -Ionen ist eine relativ schnelle Destabilisierung des Abdichtwiderstands, die man beispielsweise an der zeitlichen Entwicklung der in Abbildung 56 dargestellten Stromkurven erkennen kann. Bei Beginn der Messung ist das Stromsignal relativ glatt und hat eine Breite von etwa 15-20 pA (Gaussbreite 7 pA). Nach wenigen Minuten kommt es zu kleinen Sealeinbrüchen die in Form von Spikes und Stufen auftreten und mit der Zeit immer ausgeprägter und häufiger vorkommen.

Um die Größe der Kontaktfläche während der Annäherung und Kontaktierung mit dem Cantilever einzuschätzen, muss man die Radien der Zellen kennen. Diese kann man mit Hilfe der durchschnittlichen Kapazität abschätzen, die anhand von 25 HEK-P2X7-Zellen bestimmt wurde und (25 ± 10) pF betrug. Geht man von einer spezifischen Membrankapazität von $0,01 \text{ pF}/\mu\text{m}^2$ aus, dann ergeben sich Zellradien von ca. $(11-17) \mu\text{m}$. Nun kann man bei der Abschätzung des Kontaktradius von verschiedenen Szenarien ausgehen die in Abbildung 56 dargestellt sind. Für die geometrischen Überlegungen muss dabei entweder die Länge des Verbindungsmoleküls bei quasi kraftfreiem Kontakt oder die Andrücktiefe d bei Kontakt mit einer bestimmten Kraft benutzt werden. Mit Hilfe des Satzes von Pythagoras kann dann einfach der Radius des

Kontaktkreises bestimmt und dementsprechend der Quotient aus Kontakt- und Zellfläche gebildet werden. Grobe Werte für die verschiedenen Szenarien sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Dabei kann man bei dem verwendeten PEG (5000 g/mol) und Dextran (40000 g/mol) von einer Linkerlänge von ca. 25 nm bzw. über 100 nm ausgehen. Die Werte in Tabelle 5 zeigen, dass die Stromantwort, die auf der Kontaktfläche induziert werden kann ca. 1% der Ganzzellantwort ist. Für EDA-ATP lag diese im Bereich von 1-4 nA was bedeutet, dass das induzierte Stromsignal bei Cantileverkontakt ca. 10-40 pA betragen würde. Die Stromspur muss sich also während der Messung relativ konstant Verhalten (wie zum Beispiel nach einer bzw. drei Minuten in Abbildung 56) um die erwartete Stromantwort zu identifizieren. Die Schätzungen die hier gemacht wurden sind sehr optimistisch aufgrund der implizierten Annahme, dass alle kontaktierten Kanäle tatsächlich auch geöffnet werden können. Davon ist aber nicht auszugehen.

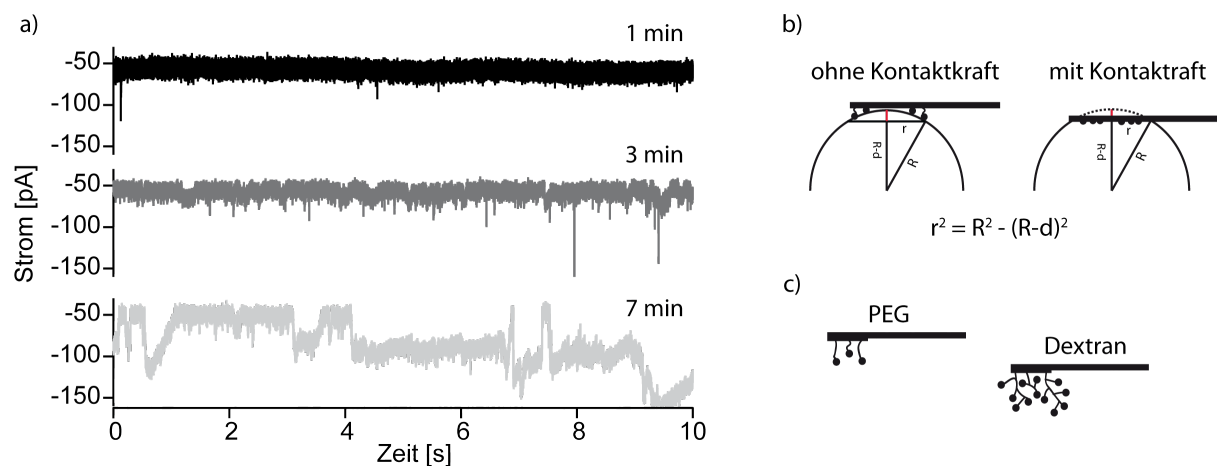


Abbildung 56 – Zeitliche Entwicklung des Abdichtwiderstands und Abschätzung des Kontaktradius. Da aufgrund der negativen Einflüsse der Ca^{2+} und Mg^{2+} -Ionen auf die Stromamplitude deren Konzentration in der Messlösung gering gehalten werden muss verliert der Abdichtwiderstand relativ schnell an Stabilität wie der zeitliche Verlauf der Stromspur (a) zeigt. Das Stromrauschen liegt bei ca. 15-20 pA. Der Radius der Kontaktfläche des flachen Cantilevers mit der Zelle kann bei Kenntnis des Zellradius R und der Eindrücktiefe d (rot) bzw. bei einem Kontakt ohne Kraftentwicklung der Linkerlänge d (rot) über $r^2 = R^2 - (R-d)^2$ abgeschätzt werden (b). Die Länge des Verbindungsmoleküls hängt dabei von der Art der Funktionalisierung ab (c).

Kontaktkraft	200 pN	500 pN	0 pN
kleine Zelle (15pF)	0,9%	2,3%	0,1%
mittlere Zelle (25pF)	0,7%	1,7%	0,1%

Tabelle 5 Anteil der kontaktierten Fläche an der Gesamtoberfläche der Zelle. Die Berechnung erfolgte anhand der geometrischen Überlegungen in Abbildung 56. Die verwendeten Zellradien waren 11 μm für die kleinen Zellen und 14 μm für die großen. Die angenommene Eindrücktiefe beträgt für die kleine Kontaktkraft 200nm (200pN) und 500nm (500pN) für die große Kontaktkraft. Als Linkerlänge wurden 25 nm (PEG 5000) angenommen.

Kombinierte Experimente

Die nach den Vorversuchen durchgeführten Experimente wurden mit verschiedenen EDA-ATP funktionalisierten Cantilevern (PEG 5000, Dextran 30000) mit variablen Kontaktkräften (200 pN bis 1000 pN) und Kontaktzeiten (1 s bis 10 s) durchgeführt. Insgesamt wurden etwa 20 HEK-P2X7-Zellen gemessen. Nur in zwei Versuchen konnte eine zur Kontaktzeit synchrone Änderung der Charakteristiken in der Stromspur identifiziert werden. Die beiden einzigen Messungen, in denen man eventuell eine Stromantwort erkennen kann, sind in Abbildung 57 abgebildet. Bei den kleinen Stufen in der Stromspur direkt nach Cantileverkontakt handelt es sich um jeweils ca. 5 pA Sprünge des Mittelwerts. In einer Stromspur während des Rückzug des Cantilevers kann man eine linear abfallende anfänglich ca. 30 pA große Stromabweichung erkennen. Vor dem Hintergrund der ca. 100 aufgenommenen Messungen und der Tatsache, dass diese Beobachtungen nicht reproduzieren werden konnten, muss man allerdings von zufälligen Ereignissen ausgehen. Für zukünftige Experimente kann man die durchgeführten als positive Negativkontrolle werten: Es wurden keine reproduzierbaren elektrischen Effekte bei der flachen Kontaktierung der Zellen mit Andrückkräften zwischen 200 pN und 1000 pN beobachtet werden.

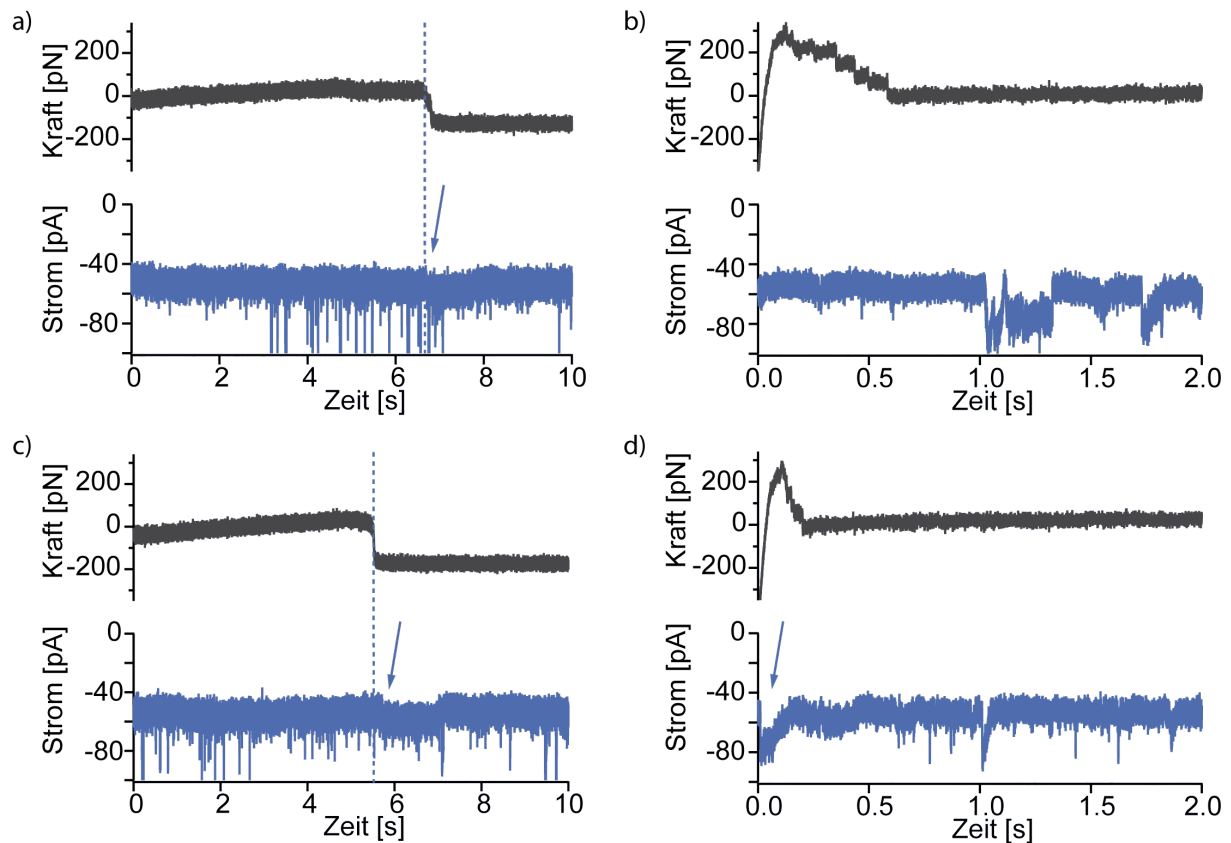


Abbildung 57 – Strom- und Kraftkurven der Andrück- und Rückzugsphase der finalen Experimente. Dargestellt sind die Andrück- (a,c) und Rückzugsplots (b,d), die als einzige unter ca. 100 Experimenten simultane Ereignisse in der Strom- und Kraftspur aufweisen. Die während des ersten Experiments (a,b) kurz nach Ausbildung des Kontakts auftretende Stromstufe von ca. 5 pA markiert durch einen Pfeil ist im zweiten Kontaktplot (c) etwas deutlicher zu erkennen. Jeweils nach ca. 1,5 s springt die Stromspur auf ihren Anfangswert zurück. Im Rückzugplot des ersten Experiments (b) ist trotz stufenformiger Abrissevents keine simultane Struktur in der Stromspur zu erkennen während im zweiten Rückzugsplot (d) eine simultan zum Antsteigen der Adhäsionskraft abnehmende Stromamplitude zu erkennen ist. Ein direktes Zusammenfallen von Abrissereignissen mit den beobachteten Strommustern ist aber auch hier nicht zu erkennen.

4.3.2 Versuche mit ionotropen Glutamatrezeptoren (GluK2)

Als Alternative zu Experimenten mit dem P2X7-Ionenkanal bot sich die Verwendung von ebenfalls in HEK-Zellen exprimierten Glutamatkanälen (GluK2) an. Ein Nachteil dieser Ionenkanäle im Vergleich zu P2X7-Kanälen ist die Eigenschaft zu desensibilisieren ($\tau_{des}=4,5\text{ms}$). Deswegen war eine Behandlung mit ConA vor der Durchführung der Messungen nötig, um die Möglichkeit zu haben, konstante Kanalströme zu beobachten. Ein entscheidender Vorteil des GluK2-Kanals war, dass ein Agonist zur Verfügung stand, der mit einer für Standard-Kopplungstechniken geeigneten reaktiven Maleimid-Gruppe ausgestattet ist. Es handelt sich hier um ein sogenanntes Maleimid-Azobenzol-Glutamat-Molekül (MAG) [17]. Da keine stabile Zelllinie, die den Glutamatrezeptor überexprimiert, zur Verfügung stand, wurden uns als Alternative transient transfizierte HEK293-Zellen zur Verfügung gestellt. Die Transfektionseffizienz dieser Zellen lag bei ca. 20%, was für Versuche mit dem planaren Patch-Clamp-System ein entscheidender Nachteil ist. Da keine Selektion der für die Messung auf der Nanoapertur immobilisierten Zelle vorgenommen werden kann, exprimiert nur ca. jede fünfte untersuchte, planar gepatchte Zelle den Glutamatkanal. Es stellte sich außerdem heraus, dass die Zellen zusätzlich sehr schlechte Sealeigenschaften besaßen. Nur ca. 50% der gepatchten Zellen erreichten Abdichtwiderstände im Gigaohmbereich. Bei allen untersuchten Zellen fiel der anfänglich erreichte maximale Abdichtwiderstand zusätzlich innerhalb von wenigen Minuten rapide ab. Als Gründe für die beobachteten schlechten Sealeigenschaften kamen drei Hauptursachen in Frage: der Stress durch den Transport zwischen den Laboratorien, die transiente Transfektion mit für Zellen leicht toxischen Transfektionsreagenzien sowie die Behandlung mit ConA. Um den Transportstress zu vermeiden, wurden folglich die Zellen in unserem Labor kultiviert und vor Ort transfiziert. Dabei wurden verschiedene Transfektionsreagenzien getestet (jetPEI, Polyplus und Metafectene Pro, Biontex). Ziel war unter anderem, die Transfektionseffizienz zu steigern und die Sealeigenschaften beim planarem Patch-Clampen zu verbessern. Neben der Glutamat-DNA wurde zusätzlich YFP-DNA (yellow fluorescent protein) in die Zellen eingeschleust um mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops und einer Neubauerzählkammer die Effizienz der Transfektion zu quantifizieren. Der maximal erreichte Wert war mit 22% nicht signifikant höher als die ursprünglichen 20%. Die Sealeigenschaften der Zellen konnten nur leicht verbessert werden.

Im Folgenden wurden kombinierte Patch-Clamp-AFM Versuche vorgenommen, um die wenigen Zellen, die ein ausreichend großes Messfenster boten, direkt mit MAG-funktionalisierten Cantilevern (via PEG5000 gebunden) zu kontaktieren. Im Anschluss sollte die Expression des Glutamatkanals bei den untersuchten Zellen mit einer Glutamatlösung überprüft werden. Durch die Zeitspanne des Aufsetzens und Positionierens des AFM reduzierte sich die Zahl der erfolgreich zu kontaktierenden Zellen zusätzlich. Insgesamt konnten ca. 10 Zellen mit einem funktionalisierten Cantilever (PEG5000) untersucht werden. Keine dieser Zellen zeigte eine signifikante Änderung in der Stromspur während des Kontakts mit dem Kraftsensor. Bei den meisten Zellen brach während der Messungen der Seal, so dass eine anschließende Überprüfung der Glutamat-Expression nicht mehr möglich war. Alle anderen Zellen zeigten keine Stromreaktion auf das Einspülen der Glutamatlösung. Es kann also davon ausgegangen werden, dass sie keine Glutamatkanäle exprimiert hatten.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass bei einer Transfektionseffizienz von nur ca. 20% und schlechten Sealeigenschaften der transient transfizierten HEK-Glutamat-

Zellen die kombinierten Patch-Clamp-AFM-Experimente nicht praktikabel waren. Der Vorteil des gebunden funktionalen MAG-Agonisten konnte nicht erfolgreich genutzt werden.

4.3.3 Vorversuche für Einzelkanalmessungen

Da ein Grund für die negativen Ergebnisse in den Versuchen mit P2X7- und GluK2-Zellen die komplexen Randbedingungen der lebenden Zellen war, wurden Experimente vorbereitet, die es ermöglichen, einzelne Kanäle in künstlichen Lipiddoppelmembranen (Bilayer) zu untersuchen. Das Signal-Rausch-Verhältnis in diesen Versuchen ist zudem um ein vielfaches größer als in Ganzzellmessungen. Voraussetzungen für ein erfolgreiches Experiment sind drei Hauptkomponenten:

- kontaktierbarer und stabiler Bilayer
- funktionale, an den Cantilever gebundene, Liganden
- funktionstüchtige Proteine im Bilayer

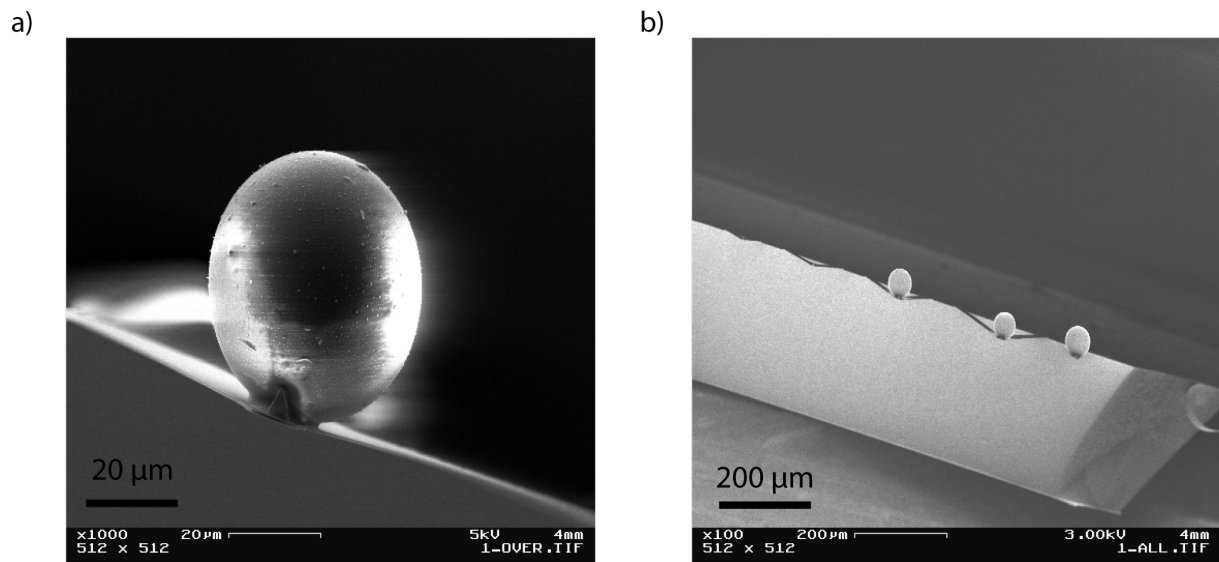


Abbildung 58 – Elektronenmikroskopische Aufnahmen von mit Epoxidharz auf Cantilever geklebte Glaskugeln. Der Durchmesser der Kugeln ist ca. 40 µm.

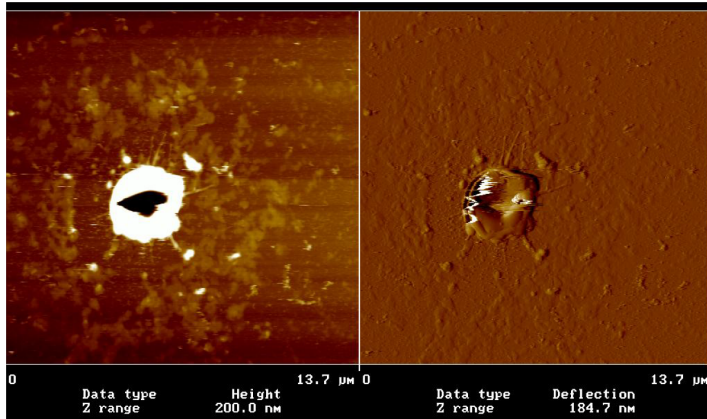
Im Folgenden werden Untersuchungen, die den ersten Punkt betreffen, beschrieben. Um eine möglichst große Kontaktfläche mit dem Bilayer zu erzielen, wurden Glaskugel mit Radien von (10 µm bis 60 µm) an die Cantilever geklebt, die dann später funktionalisiert wurden (vgl. Abbildung 58). Für diese Kugel liegt der Kontaktradius bei einer Funktionalisierung mit PEG5000 bei ca. einem Mikrometer (vgl. Abbildung 56). Da auch aufgrund der Größe der Kugel eine genaue optische Positionierung über der Apertur nicht möglich war, wurde vor der Ausbildung eines Bilayers ein Überdruck (50 mBar) angelegt. Kurz über der Oberfläche wurde dann das Maximum der durch den Flüssigkeitsstrom auf die Kugel wirkenden Kraft gesucht. Diese Position wurde im Kamerabild markiert um nach der Formierung eines Bilayer den Cantilever wieder entsprechend zu positionieren. Die Genauigkeit der Methode wurde auf ca. 5 µm abgeschätzt. Dazu wurde die Prozedur mit einem Rasterkraftmikroskop und einer Cantileverspitze durchgeführt. Nach Positionierung über dem Loch wurde von der

Umgebung ein AFM-Scan aufgenommen und die Position des Cantilevers im Kamerabild markiert. Nach einer erneuten Positionierung des Cantilevers auf die markierte Position wurde wiederum ein AFM-Scan durchgeführt und mit dem ersten Scan abgeglichen. Der durchschnittliche Versatz der repositionierten Spitze lag bei 5 μm .

Die Kontaktierbarkeit des Bilayers wurde nun mit unfunktionalisierten und pegylierten Kugeln untersucht. Die Bilayer wurden dabei mit Hilfe von großen Liposomen hergestellt (1-60 μm , GUV giant unilamellar vesicles). Die GUVs wurden mit Hilfe der Vesicle Prep Pro (nanjion, München) mit einer Mischung aus DPhPC (1,2-Diphytanoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine) und 10% Cholesterol hergestellt. Diese wurden, wie bei den Zellexperimenten die Zellen, mit Unterdruck (30 mBar) auf die Apertur des Glaschips gesaugt, wo sie platzten und einen Bilayer bildeten. Der durchschnittliche erreichte Abdichtwiderstand lag bei über 20 $\text{G}\Omega$, das Rauschen bei ca. 300 fA. Mit den unterschiedlichen Kugeln wurde nun versucht, die Bilayer zu kontaktieren. Dazu wurden sie an der mit dem Überdruck gefundenen und markierten Stelle mit einer Kraft von 500 pN auf bzw. in die Nähe der Apertur gedrückt. Wenn keine Zerstörung der Lipidschicht als Sealbruch zu verzeichnen war, wurde die Kugel manuell über den Bereich der Apertur gekratzt. In selten Fällen war es dadurch möglich, mit unfunktionalisierten Kugel einen Sealbruch herbeizuführen. Es schien also, dass der Bilayer extrem stabil oder nur selten kontaktierbar war. Die gleichen Experimente wurden nun mit einem Überdruck von ((20-100) mBar) wiederholt. Hier konnte häufig ein Sealbruch mit den unfunktionalisierten und teilweise auch mit den pegylierten Kugeln verzeichnet werden. Meist war dies allerdings nicht beim Erstkontakt sondern bei der darauffolgenden Abrasterung der Umgebung des vermuteten Kontaktbereichs der Fall. Es scheint also, dass die Bilayer häufig unzugänglich für Kugeln mit Radius über 10 μm lag. Um die Topographie der Patch-Clamp-Aperturen abzubilden wurden nun vor jeder Bilayerformation AFM-Scans der vorgenommen. Dazu wurden die in den Zellexperimenten verwendeten spitzen MLCT-Cantilever verwendet. Eine typische Topographie ist in Abbildung 59 zu sehen. Nach der Abbildung des Aperturbereichs wurde ein Bilayer gebildet und erneut ein Abbild des Bereiches gemacht. In allen Fällen ist es hierbei zu einem Sealbruch gekommen, sobald die Spitze in die Aperturzone gerastert wurde. Die Kraft des Kontaktscans wurde dabei jeweils möglichst minimal gewählt. Am Anfang der Scans lag sie bei ca. 100 pN, stieg dann aber bedingt durch die Drift des Cantilevers variabel an.

Schlussfolgerungen aus den durchgeführten Experimenten sind folgende. Die Genauigkeit der Positionierung des Cantilevers über dem Loch ist mit 5 μm bei einem Kontaktradius von ca. 1 μm zu gering um den Bilayer zuverlässig direkt zu treffen. Die Genauigkeit der Methode der Aperturfindung mit Hilfe des Überdrucks wurde nicht ermittelt. Die Bilayer schienen bei Überdruck leichter kontaktierbar zu sein. Die Beobachtung, dass alle Bilayer bei den AFM-Scans durch den Kontakt mit der unfunktionalisierten Cantileverspitze kaputt gingen weist darauf hin, dass die Bilayer in in weniger als einem Mikrometer Abstand von der Oberfläche lagen. Die Topographie der Aperturen zeigt, wahrscheinlich Produktionsbedingt, eine Erhebung von ca. 100 nm um die Apertur herum. Wird der Bilayer durch den Überdruck nicht über dieses Level hinaus gedrückt, besteht keine Chance mit einer harten Kugel von über 10 μm Radius einen Kontakt herzustellen. Zukünftige Experimente müssen also mit einer alternativen Technik durchgeführt werden. In Frage kommen zum Beispiel weiche Agarosebeads, die sich der Oberflächenstruktur besser anpassen können [74]. Die guten Sealeigenschaften der Bilayer mit dem sehr geringen Rauschen sind vielversprechend.

a)



b)

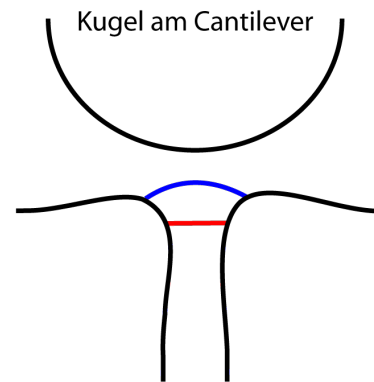


Abbildung 59 – AFM-Scan der Patch-Clamp-Apertur (a) und Skizze des in der Apertur ausgebildeten Bilayers (b). Der AFM-Scan einer Apertur zeigt Erhebungen im Bereich von 100 nm um das Loch herum. Die schlechte Kontaktierbarkeit der Bilayer ohne Überdruck lässt sich durch eine in das Loch zurückgezogene Position begründen. Bei Überdruck besteht die Möglichkeit, dass der Bilayer über den Level der die Apertur umgebenden Unebenheiten hinausragt.

5 Ausblick

Die simultane Vermessung der nichtlinearen Kapazität und der Elektromotilität haben gezeigt, dass mit dem vorhandenen System eine reproduzierbare Differenz dieser beiden beobachtet werden kann. Mit nur drei Zellen ist die Anzahl der Messungen allerdings nicht ausreichend, um eine statistisch sichere Aussage tätigen zu können. Nur wenige Zellen zeigen eine ausreichend starke Reaktion, um den sigmoidalen Charakter der Elektromotilität präzise quantifizieren zu können. Bei den insgesamt etwa 100 Prestinzellen, die mit Hilfe einer indentierten Cantileverspitze kontaktiert wurden, waren nur ca. 10 dabei, die eine dafür ausreichend deutliche Reaktion zeigten. Um die Ausbeute der Methode zu erhöhen wäre es sinnvoll, die Breite des Lock-in-Pulses zu erhöhen. Dabei muss aber darauf geachtet werden, dass die Sealeigenschaften der Zellen nicht durch zu extreme Spannungswerte negativ beeinflusst werden. Des weiteren ist eine kleinere Amplitude der Sinuspulse sinnvoll, damit die Breite der simultan gemessenen Reaktionskurve verringert wird. Hierbei muss allerdings darauf geachtet werden, dass das Signal-Rausch-Verhältnis ausreichend groß bleibt. Das Potential der Vermessung einer Differenz der beiden charakteristischen Signaturen von Prestinzellen zeigen die erst kürzlich veröffentlichten Messungen von Song und Santos-Sachhi [28]. Die Ergebnisse ließen sich mit einem neuen Modell erklären, das im Grundlagenteil beschrieben wurde. Da dies bisher die einzige Messung ist, die ein bisher grundlegendes und allgemein angenommenes Prinzip der Funktionsweise von Prestin in Frage stellt – nämlich die direkte Kopplung der Elektromotilität mit der nichtlinearen Kapazität – haben entsprechende Messungen vor allem an alternativen Systemen Relevanz. Das heterologe Expressionssystem ist als Vergleich zu den bisher an äußeren Haarzellen durchgeführten Messungen interessant, da Effekte von anderen Molekülen als Prestin hier unwahrscheinlicher sind.

Die eingeführte Methode der kontinuierlichen Reaktionswertbestimmung hat sich als sehr aufschlussreich herausgestellt. Die erreichte Präzision der gemittelten Daten lässt auch sehr kleine, für die bisher strichprobenartig durchgeführten Messungen unsichtbare, Reaktionen beobachten. Eine Verwendung eines Sinuspulses anstatt der Dreiecksspannung ist eventuell von Vorteil, da viskose Effekte der Membran anhand der Phase besser quantifiziert werden könnten. Die wiederholten Rampenpulse waren motiviert durch eine bessere Vergleichbarkeit mit den bisher ebenfalls mit Rampenpulsen ermittelten Daten. Interessant an der Vermessung der spannungsinduzierten Membranbewegung mit in die Membran drückenden Cantileverspitzen ist vor allem, dass die Reaktion des Cantilevers relativ genau mit der Kraft der Membran auf den Cantilever in Verbindung steht. Eine Aufteilung der auf den Cantilever wirkenden Kraft in die Komponenten Zytoskelett und Membran wurde andeutungsweise in den entsprechenden Kapiteln dieser Arbeit durchgeführt. Das einzige noch bestehende, aber nicht zu unterschätzende Problem zur eindeutigen Interpretation ist die Verknüpfung der Reaktion mit dem Kontaktwinkel und dem Kontaktumkreis der Zellmembran. Eine verringerte oder verstärkte Reaktion des Cantilevers konnte bisher nicht direkt mit einer der beiden Größen verknüpft werden. Eine Verwendung von unterschiedlichen Spitzengeometrien könnte hier als Lösungsansatz in Frage kommen. Drückt man beispielsweise einen stumpfen Zylinder in die Membran könnte man von einer konstanten Kontaktumkreis ausgehen. Eine andere Möglichkeit wäre, die Cantileverspitze zu passivieren, um die Affinität der Zellmembran zu unterdrücken. Perfekt passivierte Spitzen würden einem dann ermöglichen, bei

Eindrückungsversuchen genau die Entwicklung des Kontaktumkreises und damit der tatsächlichen Eindrückungstiefe zu studieren und mit den vorhandenen Modellen abzugleichen.

Die Versuche, Ionenkanäle mit Hilfe funktionalisierter Cantilever kontrolliert zu öffnen, haben sich in den Experimenten im Ganzzellmodus als bisher nicht praktikabel herausgestellt. Gründe waren die schlechten Sealeigenschaften, die schlechte Transfektionseffizienz bei GluK2 sowie der negative Einfluss der für den Seal benötigten divalenten Magnesium- und Kalzium-Ionen bei den P2X7-Kanälen. Ein erfolgsversprechender zukünftiger Versuch an ganzen Zellen würde das Vorhandensein einer stabilen Zelllinie mit guten Sealeigenschaften sowie einem Agonisten mit entsprechender Kopplungsmöglichkeit voraussetzen, der nicht durch die Zusammensetzung des Sealehancers behindert wird. Als möglicher Kandidat kommt der nikotinische Acetylcholinrezeptor in Frage, da ein entsprechender Agonist [75], ausgestattet mit einer reaktiven Maleimidgruppe sowie eine stabile Zelllinie über die Firma nanji[on zur Verfügung gestellt werden könnte. Die optimistische Abschätzung der zu erwarteten Stromantwort im Falle des P2X7-Rezeptor hat allerdings gezeigt, dass die Stromantworten bei den mit dem flachen Cantilever erreichbaren Kontaktflächen auch hier nur schwach ausfallen würde. Um präzise Informationen bezüglich der zeitlichen Verläufe und der genauen Stromstärken zu erlangen, würde wahrscheinlich eine sehr großen Anzahl an erfolgreichen Versuchen erforderlich sein. Deswegen liegt die Zukunft dieses Projekts eindeutig in der Verwendung von Lipiddoppelschichten. Sind die Probleme, die sich auf dem Weg zur Herstellung eines mechanischen Kontaktes des Cantilevers zur Lipidschicht stellen zu lösen, ermöglicht diese Methode theoretisch die gezielte Öffnung von einzelnen Ionenkanälen. Als großes Problem bei der Kontaktierung der Lipiddoppelschicht hat sich die relativ schlecht zu reproduzierende Positionierung mittels der Mikrometerschrauben erwiesen. Zusätzlich ist die optische Kontrolle schwierig, da sich die Apertur durch die optischen Eigenschaften der Kanalgeometrie schlecht lokalisieren lässt. Ein stabiles xy-Piezostellsystem könnte diese Probleme teilweise lösen. Eine weitere vielversprechende Lösung des Kontaktierproblems ist die Verwendung von Agarose-Beads [74] in Kombination mit einem angelegten Überdruck, um den Bilayer an die Oberfläche zu drücken und nach oben zu wölben. Neben ligandengesteuerten Ionenkanälen sind auch solche Kanäle und Porine interessant, die einen direkt zugänglichen mechanischen Öffnungsmechanismus bereitstellen. Als Beispiel ist hier vor allem das Porin FhuA [76] zu nennen, das bereits in Vorversuchen in einer Kooperation mit der Gruppe von Daniel Müller (ETH Zürich) in Bilayer eingebaut, aber nicht geöffnet werden konnte.

6 Anhang

6.1 Berechnungen

6.1.1 Rechnung 1

Bestimmung der zeitlichen Ableitung der Membranspannung.

$$\begin{aligned}
 I_{MC}(t) &= \frac{U(t) - U_M(t)}{R_A} - \frac{U_M(t)}{R_M} = C(U)\dot{U}_M(t) + \frac{\partial C}{\partial U} \frac{dU_M}{dt} U_M(t) \\
 \Leftrightarrow \frac{U(t)}{R_A} - U_M(t) \left(\frac{1}{R_M} + \frac{1}{R_A} \right) &= \dot{U}_M(t) \left(C(U) + \frac{\partial C}{\partial U} U_M(t) \right) \\
 \Leftrightarrow \dot{U}_M(t) &= \frac{\frac{U(t)}{R_A} - U_M(t) \left(\frac{1}{R_M} + \frac{1}{R_A} \right)}{\left(C(U) + \frac{\partial C}{\partial U} U_M(t) \right)}
 \end{aligned}$$

6.1.2 Rechnung 2

Die theoretisch erwartete Antwort auf einen Rampenpuls.

$$U(t) = U' t = \frac{C_M}{G_A} \dot{U}_M(t) + \frac{G_M + G_A}{G_A} U_M(t)$$

Nach einer Laplacetransformation ergibt sich im Bildraum

$$\frac{U'}{s^2} = \frac{C_M}{G_A} \bar{U}_M(s)s + U_M(0) + \frac{G_M + G_A}{G_A} \bar{U}_M(s)$$

Auflösen nach $\bar{U}_M(s)$ ergibt mit $U_M(0) = 0$

$$\bar{U}_M(s) = \frac{U'}{s^2} \cdot \frac{G_A}{C_M s + G_M + G_A} = \frac{U' G_A}{C_M} \cdot \frac{1}{s^2} \cdot \frac{1}{s + \alpha}$$

wobei

$$\alpha = \frac{G_M + G_A}{C_M}$$

Durch Rücktransformation erhält man das gesuchte Ergebnis

$$U_M(t) = \frac{U' C_M R_A R_M^2}{(R_A + R_M)^2} \left(e^{-\frac{R_A + R_M}{R_A R_M C_M} t} - 1 \right) + \frac{R_M U'}{R_A + R_M} t$$

6.2 Zellkultur

HEK293-Prestinzellen, stabil transfiziert mit Prestin und YFP [77]:

Medium: DMEM mit Pyruvate und L-Glutamine, 10% FBS, 10mM HEPES, 4,4 µg/ml
Blasticidin, 140 µg/ml Zeocine, eingestellt auf pH 7
Aktivierung bei 50% Konfluenz mit 1 µg/ml

HEK293-Zellen

Medium: DMEM mit Pyruvate und L-Glutamine, 10% FBS, 10mM HEPES, eingestellt auf
pH 7

P2X7-HEK293-Zellen

Medium: DMEM mit Pyruvate und L-Glutamine, 10% FBS, 10mM HEPES, 400 µg/ml G418
(Geneticin) eingestellt auf pH 7

6.3 Funktionalisierung der Cantilever

MAG-Cantilever

Epoxyasilan+Cantilever

10min	UV-Ozoncleaner
1min	Epoxyasilan(100%) 2x Waschen Isoprop 1x Waschen H2O
30-60min	Ausbacken (80°C)

PEG	über Nacht	SH-PEG-NH ₂ in BP 20mM (10-50mM) (pH Kontrolle) 3x Waschen H ₂ O
	1h	TCEP in KP 20mM (10-50mM) 3x Waschen H ₂ O
	1h	Glutamat-MAG-2-Maleimid in KP (2,5 mM)

Dextran	über Nacht	Dextran 40.000 in BP (10mg/ml) 1x Waschen H ₂ O
	1h	Trauts in KP (10mM) 2x Waschen H ₂ O
	30min	TCEP in KP 20mM (10-50mM) 2x Waschen H ₂ O
	1h	Glutamat-MAG-2-Maleimid in KP (2,5 mM)

EDA-ATP-Cantilever

Aminosilan+Cantilever

10min	UV-Ozoncleaner
2min	Aminosilan((1 ml EtOH + 1% H ₂ O) + 1ml Aminosilan) Waschen (Toluol, Isoprop, H ₂ O)
30-60min	Ausbacken (80°C)

Parallel

1.	1h	NHS-PEG-MAL in BP 50mM (10-50mM) (pH Kontrolle) 3x Waschen H ₂ O
2.	1h	0,5 mM Trauts (KP) + 0,25 mM EDA-ATP
dann	1h	1. + 2. 3x Waschen H ₂ O

7 Literaturverzeichnis

1. Baker, M., *Making membrane proteins for structures: a trillion tiny tweaks*. Nat Methods, 2010. **7**(6): p. 429-34.
2. Bezanilla, F., *Ion channels: from conductance to structure*. Neuron, 2008. **60**(3): p. 456-68.
3. Ashmore, J., *Cochlear outer hair cell motility*. Physiol Rev, 2008. **88**(1): p. 173-210.
4. North, R.A., *Molecular physiology of P2X receptors*. Physiol Rev, 2002. **82**(4): p. 1013-67.
5. Kawate, T., et al., *Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state*. Nature, 2009. **460**(7255): p. 592-8.
6. Surprenant, A., et al., *The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7)*. Science, 1996. **272**(5262): p. 735-8.
7. Yan, Z., et al., *Experimental characterization and mathematical modeling of P2X7 receptor channel gating*. J Neurosci, 2010. **30**(42): p. 14213-24.
8. Jiang, L.H., et al., *Subunit arrangement in P2X receptors*. J Neurosci, 2003. **23**(26): p. 8903-10.
9. Ding, S. and F. Sachs, *Single channel properties of P2X2 purinoceptors*. J Gen Physiol, 1999. **113**(5): p. 695-720.
10. Hattori, M. and E. Gouaux, *Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors*. Nature, 2012. **485**(7397): p. 207-12.
11. Wollmuth, L.P. and S.F. Traynelis, *Neuroscience: Excitatory view of a receptor*. Nature, 2009. **462**(7274): p. 729-31.
12. Traynelis, S.F., et al., *Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function*. Pharmacol Rev, 2010. **62**(3): p. 405-96.
13. Mayer, M.L., *Glutamate receptors at atomic resolution*. Nature, 2006. **440**(7083): p. 456-62.
14. Barberis, A., S. Sachidhanandam, and C. Mulle, *GluR6/KA2 kainate receptors mediate slow-deactivating currents*. J Neurosci, 2008. **28**(25): p. 6402-6.
15. Wilding, T.J. and J.E. Huettnner, *Activation and desensitization of hippocampal kainate receptors*. J Neurosci, 1997. **17**(8): p. 2713-21.
16. Mayer, M.L., *Crystal structures of the GluR5 and GluR6 ligand binding cores: molecular mechanisms underlying kainate receptor selectivity*. Neuron, 2005. **45**(4): p. 539-52.
17. Volgraf, M., et al., *Allosteric control of an ionotropic glutamate receptor with an optical switch*. Nat Chem Biol, 2006. **2**(1): p. 47-52.
18. Brownell, W.E., et al., *Evoked mechanical responses of isolated cochlear outer hair cells*. Science, 1985. **227**(4683): p. 194-6.
19. Ashmore, J.F., *A fast motile response in guinea-pig outer hair cells: the cellular basis of the cochlear amplifier*. J Physiol, 1987. **388**: p. 323-47.
20. Zheng, J., et al., *Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells*. Nature, 2000. **405**(6783): p. 149-55.
21. Oliver, D., et al., *Intracellular anions as the voltage sensor of prestin, the outer hair cell motor protein*. Science, 2001. **292**(5525): p. 2340-3.
22. Song, L. and J. Santos-Sacchi, *Conformational state-dependent anion binding in prestin: evidence for allosteric modulation*. Biophys J, 2010. **98**(3): p. 371-6.
23. Homma, K. and P. Dallos, *Dissecting the electromechanical coupling mechanism of the motor-protein prestin*. Commun Integr Biol, 2011. **4**(4): p. 450-3.

24. Ashmore, J.F., *Forward and reverse transduction in the mammalian cochlea*. Neurosci Res Suppl, 1990. **12**: p. S39-50.
25. Dong, X.X., M. Ospeck, and K.H. Iwasa, *Piezoelectric reciprocal relationship of the membrane motor in the cochlear outer hair cell*. Biophys J, 2002. **82**(3): p. 1254-9.
26. Frank, G., W. Hemmert, and A.W. Gummer, *Limiting dynamics of high-frequency electromechanical transduction of outer hair cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(8): p. 4420-5.
27. He, D.Z. and P. Dallos, *Somatic stiffness of cochlear outer hair cells is voltage-dependent*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(14): p. 8223-8.
28. Song, L. and J. Santos-Sacchi, *Disparities in voltage-sensor charge and electromotility imply slow chloride-driven state transitions in the solute carrier SLC26a5*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(10): p. 3883-8.
29. Armstrong, C.M. and F. Bezanilla, *Charge movement associated with the opening and closing of the activation gates of the Na channels*. J Gen Physiol, 1974. **63**(5): p. 533-52.
30. Santos-Sacchi, J., *Reversible inhibition of voltage-dependent outer hair cell motility and capacitance*. J Neurosci, 1991. **11**(10): p. 3096-110.
31. Santos-Sacchi, J., S. Kakehata, and S. Takahashi, *Effects of membrane potential on the voltage dependence of motility-related charge in outer hair cells of the guinea-pig*. J Physiol, 1998. **510** (Pt 1): p. 225-35.
32. Dong, X.X. and K.H. Iwasa, *Tension sensitivity of prestin: comparison with the membrane motor in outer hair cells*. Biophys J, 2004. **86**(2): p. 1201-8.
33. Santos-Sacchi, J. and G. Huang, *Temperature dependence of outer hair cell nonlinear capacitance*. Hear Res, 1998. **116**(1-2): p. 99-106.
34. Wang, X., et al., *Prestin forms oligomer with four mechanically independent subunits*. Brain Res, 2010. **1333**: p. 28-35.
35. Murakoshi, M., et al., *Imaging by atomic force microscopy of the plasma membrane of prestin-transfected Chinese hamster ovary cells*. J Assoc Res Otolaryngol, 2006. **7**(3): p. 267-78.
36. Hallworth, R. and M.G. Nichols, *Prestin in HEK cells is an obligate tetramer*. J Neurophysiol, 2012. **107**(1): p. 5-11.
37. Iida, K., et al., *Construction of an expression system for the motor protein prestin in Chinese hamster ovary cells*. Hear Res, 2005. **205**(1-2): p. 262-70.
38. Sturm, A.K., et al., *Functional expression and microdomain localization of prestin in cultured cells*. Otolaryngol Head Neck Surg, 2007. **136**(3): p. 434-9.
39. Binnig, G., C.F. Quate, and C. Gerber, *Atomic force microscope*. Phys Rev Lett, 1986. **56**(9): p. 930-933.
40. Radmacher, M., et al., *From molecules to cells: imaging soft samples with the atomic force microscope*. Science, 1992. **257**(5078): p. 1900-5.
41. Moy, V.T., E.L. Florin, and H.E. Gaub, *Intermolecular forces and energies between ligands and receptors*. Science, 1994. **266**(5183): p. 257-9.
42. Rotsch, C. and M. Radmacher, *Drug-induced changes of cytoskeletal structure and mechanics in fibroblasts: an atomic force microscopy study*. Biophys J, 2000. **78**(1): p. 520-35.
43. Zhang, P.C., A.M. Keleshian, and F. Sachs, *Voltage-induced membrane movement*. Nature, 2001. **413**(6854): p. 428-32.
44. Mosbacher, J., et al., *Voltage-dependent membrane displacements measured by atomic force microscopy*. J Gen Physiol, 1998. **111**(1): p. 65-74.
45. Butt, H.J. and M. Jaschke, *CALCULATION OF THERMAL NOISE IN ATOMIC-FORCE MICROSCOPY*. Nanotechnology, 1995. **6**(1): p. 1-7.

46. Jaschke, M. and H.J. Butt, *HEIGHT CALIBRATION OF OPTICAL-LEVER ATOMIC-FORCE MICROSCOPES BY SIMPLE LASER INTERFEROMETRY*. Review of Scientific Instruments, 1995. **66**(2): p. 1258-1259.
47. Cole, K.S., *Mostly membranes (Kenneth S. Cole)*. Annu Rev Physiol, 1979. **41**: p. 1-24.
48. Hodgkin, A.L. and A.F. Huxley, *A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve*. J Physiol, 1952. **117**(4): p. 500-44.
49. Neher, E. and B. Sakmann, *Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres*. Nature, 1976. **260**(5554): p. 799-802.
50. Fertig, N., R.H. Blick, and J.C. Behrends, *Whole cell patch clamp recording performed on a planar glass chip*. Biophys J, 2002. **82**(6): p. 3056-62.
51. Brueggemann, A., et al., *Ion channel drug discovery and research: the automated Nano-Patch-Clamp technology*. Curr Drug Discov Technol, 2004. **1**(1): p. 91-6.
52. Neher, E. and A. Marty, *Discrete changes of cell membrane capacitance observed under conditions of enhanced secretion in bovine adrenal chromaffin cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(21): p. 6712-6.
53. J.O'M Bockris, A.K.N.R., *Modern Electrochemistry 2*. 1973, New York: Plenum Press.
54. H.-J. Butt, K.G., M. Kappl, *Physics and Chemistry of Interfaces*. 2003, Weinheim: Wiley-VCH.
55. Hertz, H., *Über die Berührung fester elastischer Körper*, in *Journal für die reine und angewandte Mathematik (Crelle's Journal)* 1882. p. 156.
56. Sneddon, I.N., *The relation between load and penetration in the axisymmetric boussinesq problem for a punch of arbitrary profile*. International Journal of Engineering Science, 1965. **3**(1): p. 47-57.
57. Rico, F., et al., *Probing mechanical properties of living cells by atomic force microscopy with blunted pyramidal cantilever tips*. Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys, 2005. **72**(2 Pt 1): p. 021914.
58. Darling, E.M., et al., *A thin-layer model for viscoelastic, stress-relaxation testing of cells using atomic force microscopy: do cell properties reflect metastatic potential?* Biophys J, 2007. **92**(5): p. 1784-91.
59. Wu, H.W., T. Kuhn, and V.T. Moy, *Mechanical properties of 1929 cells measured by atomic force microscopy: Effects of anticytoskeletal drugs and membrane crosslinking*. Scanning, 1998. **20**(5): p. 389-397.
60. Vandamme, M. and F.-J. Ulm, *Viscoelastic solutions for conical indentation*. International Journal of Solids and Structures, 2006. **43**(10): p. 3142-3165.
61. Cheng, Y.-T. and C.-M. Cheng, *Scaling, dimensional analysis, and indentation measurements*. Materials Science and Engineering: R: Reports, 2004. **44**(4-5): p. 91-149.
62. Rosenbluth, M.J., W.A. Lam, and D.A. Fletcher, *Force microscopy of nonadherent cells: a comparison of leukemia cell deformability*. Biophys J, 2006. **90**(8): p. 2994-3003.
63. Hochmuth, R.M., *Micropipette aspiration of living cells*. J Biomech, 2000. **33**(1): p. 15-22.
64. Pamir, E., et al., *Planar patch-clamp force microscopy on living cells*. Ultramicroscopy, 2008. **108**(6): p. 552-7.
65. Hörber, J.K., et al., *A look at membrane patches with a scanning force microscope*. Biophys J, 1995. **68**(5): p. 1687-93.

66. Hamill, O.P., et al., *Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches*. Pflugers Arch, 1981. **391**(2): p. 85-100.
67. Lindau, M. and E. Neher, *Patch-clamp techniques for time-resolved capacitance measurements in single cells*. Pflugers Arch, 1988. **411**(2): p. 137-46.
68. Hooke, R. and T.A. Jeeves, `` *Direct Search*'' *Solution of Numerical and Statistical Problems*. J. ACM, 1961. **8**(2): p. 212-229.
69. Arthur F. Kaupe, J., *Algorithm 178: direct search*. Commun. ACM, 1963. **6**(6): p. 313-314.
70. Santos-Sacchi, J., et al., *Effects of membrane potential and tension on prestin, the outer hair cell lateral membrane motor protein*. J Physiol, 2001. **531**(Pt 3): p. 661-6.
71. Schmitz, J., M. Benoit, and K.E. Gottschalk, *The viscoelasticity of membrane tethers and its importance for cell adhesion*. Biophys J, 2008. **95**(3): p. 1448-59.
72. Zhang, R., et al., *Prestin modulates mechanics and electromechanical force of the plasma membrane*. Biophys J, 2007. **93**(1): p. L07-9.
73. Qian, F., et al., *Combining optical tweezers and patch clamp for studies of cell membrane electromechanics*. Rev Sci Instrum, 2004. **75**(9): p. 2937-2942.
74. Gump, H., et al., *Triggering enzymatic activity with force*. Nano Lett, 2009. **9**(9): p. 3290-5.
75. Tochitsky, I., et al., *Optochemical control of genetically engineered neuronal nicotinic acetylcholine receptors*. Nat Chem, 2012. **4**(2): p. 105-11.
76. Thoma, J., et al., *Out but not in: the large transmembrane beta-barrel protein FhuA unfolds but cannot refold via beta-hairpins*. Structure, 2012. **20**(12): p. 2185-90.
77. Meltzer, J. and J. Santos-Sacchi, *Temperature dependence of non-linear capacitance in human embryonic kidney cells transfected with prestin, the outer hair cell motor protein*. Neurosci Lett, 2001. **313**(3): p. 141-4.

8 Danksagung

Auf dem Weg zu dieser Arbeit wurde ich von unheimlich vielen Leuten unterstützt. Mein Dank gebührt unter anderem

Hermann Gaub, dafür dass wir in einem so unheimlich positiven Arbeitsumfeld experimentieren können und natürlich für das gute und exotische Essen.

Martin Benoit, für seine unvergleichlich positive Art und Unterstützung bei allem, was mir so in die Quere kam.

Mathias Strackharn, als guten Tippgeber, Diskussionspartner und Bürokollegen und nicht zu vergessen einzigen wirklichen Hubschraubergegner.

Stefan Stahl, für seine Geduld und Ruhe, mit der er meine anfänglichen Igor-Fragen beantwortet hat und seine allgemein guten Tipps.

Angelika Kardinal, dafür dass ich fast noch lieber im Labor war als im Büro.

Tom Nicolaus, für die Geduld bei meiner ganzen Fragerei über die Funktionalisierung.

Jochen Müller, für die gute Zeit und die Diskussionen auf meinem Endspurt.

Stephan Heucke, dafür dass er gerade meine Arbeit druckt.

Diana Pippig, für ihre ganzen Kuchen und die Hilfen im Labor.

Sandra Baumann, für ihre Aufpäppelung meiner kranken Zellen.

Marcus Otten, für die guten Diskussionen und die tollen konfokalen Bilder.

Andrea Brüggeman und den nan]i[on's, für die erste Hilfe bei den verschiedensten Patch-Clamp Notfällen und die gemeinsamen Messungen. Außerdem für die Bereitstellung der P2X7 Zellen.

Hubert und Maria Krammer, für die schönste bayrische Hochzeit.

Stephan Mauell, für die Bilder am REM, die sich auch in dieser Arbeit befinden.

Ediz Sariisik, für die lustigen Mensamittage.

Philip Severin, für Ratschläge und Biere.

Susanne Kempter, für die Hilfe unter anderem am TEM.

Dominik Ho, der mich auf die Fährte des LS Gaub geführt hat.

den Stemplern, dass sie so lieb sind und mich manchmal auf der Couch schlafen lassen.

den Nashcats, für ihren lustigen Gruppennamen.

Elias Puchner, dafür ein so gutes Vorbild gewesen zu sein mit dem man auch noch feiern konnte.

Daniel Müller und Yosh Thoma, für die produktive Zeit und das Diskussionsbier jeden Abend.

Silke Kirchner und Patrick Urban, für die gute Zusammenarbeit bei der Bekämpfung des Vesikelteufels.

Johannes Frohnmayr, für seine Unterstützung bei der Zelllaborarbeit und dem Computerzeugs.

Stephan Manus, für seine kurze aber umso entscheidendere Hilfe bei der Stromsimulation.

Michael Mederos y Schnitzler, für den entscheidenden Hinweis wie Kapazitätsmessung nicht geht.

Martin Sumser und Dirk Trauner, für die Glutamatzellen und den Support bei der Transfektion.

allen, die ich vergessen habe und mir dafür nicht böse sind.

meiner Familie, dass ich so ein glücklicher Mensch bin und natürlich Marie, dem Sonnenschein und gleichzeitig Rückhalt in meinem Leben.